

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología



**PAPEL DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO EN
EL ALCOHOLISMO: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS
Y TERAPÉUTICAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Marina Rubio Gómez

Bajo la dirección de los doctores
José Antonio Ramos Atance
José Javier Fernández Ruiz

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-1038-3**

© Marina Rubio Gómez, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA



PAPEL DEL SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO
EN EL ALCOHOLISMO: IMPLICACIONES
FISIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS

Memoria presentada por Marina Rubio Gómez
para obtener el Grado de Doctor en Biología

Madrid, 2008

JOSÉ ANTONIO RAMOS ATANCE, Doctor en Ciencias Químicas y JOSÉ JAVIER FERNÁNDEZ RUIZ, Doctor en Ciencias Biológicas, Catedráticos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Papel del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo: Implicaciones fisiológicas y terapéuticas” presentada por Marina Rubio Gómez, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado.

VºBº

VºBº

Dr. José Antonio Ramos Atance

Dr. José Javier Fernández Ruiz

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Doctores José Antonio Ramos Atance y José Javier Fernández Ruiz.

Abreviaturas

5-HT	serotonina (5-hidroxitriptamina)
2-AG	2-araquidonoil-glicerol
ACh	acetilcolina
ACEA	araquidonoil-2-cloroetilamida
ACPA	araquidonoilciclopropilamida
ACTH	hormona corticotropa
ADE	efecto de privación de alcohol, del inglés <i>alcohol deprivation effect</i>
ADH	enzima alcohol deshidrogenasa
ALDH	enzima aldehído deshidrogenasa
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
AMT	transportador de anandamida
BLA	amígdala basolateral
CART	transcritos regulados por cocaína y anfetaminas
CB ₁	receptor cannabinoide tipo 1
CB ₂	receptor cannabinoide tipo 2
CBD	(-)-cannabidiol
CCK	colecistoquinina
CPP	condicionamiento preferencial de plaza, del inglés <i>conditioned place preference</i>
CRF	factor liberador de corticotropina
DA	dopamina
DAGL	diacilglicerol lipasa
DIV	día <i>in vitro</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DYN	dinorfinas
EC	endocannabinoides
ENK	encefalinas
EPSC	corriente postsináptica excitatoria
FAAH	amido hidrolasa de ácidos grasos
GABA	ácido γ -amino butírico
GABA _A	receptor para el ácido γ -amino butírico de tipo A
GABA _B	receptor para el ácido γ -amino butírico de tipo B
GLU	glutamato
GPR	receptores acoplados a proteínas G, del inglés <i>G-protein coupled receptors</i>
HHA	eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
IPSC	corriente postsináptica inhibitoria

LDH	lactato deshidrogenasa
LEA	N-linoleíletanolamina
LTD	depresión a largo plazo
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
NA	noradrenalina
NAc	núcleo accumbens
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido
NADA	N-araquidonil-dopamina
NAEs	N-acíletanolaminas
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NAPE	N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina
NAT	N-acil-transferasa
NMDA	ácido N-metil-D-aspartico
NPY	neuropéptido Y
NR1, NR2	subunidades del receptor NMDA de tipo 1 o 2
OEA	N-oleíletanolamina
PAG	sustancia gris periacueductal
PDYN	prodinorfina
PEA	N-palmitoíletanolamina
PENK	proencefalina
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
POMC	proopiomelanocortina
PPAR- α	<i>peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha</i>
sP	ratas preferentes <i>Sardinian Preferring</i>
SCE	sistema cannabinoide endógeno
SEA	N-estearoíletanolamina
SN	sustancia nigra
SNC	sistema nervioso central
THC	delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid 1</i> (receptor vanilloide tipo 1)
VTA	área tegmental ventral

Nota: dado lo extendido de uso de la lengua inglesa en el ámbito científico en algunas ocasiones se emplearan las abreviaturas correspondientes al inglés, ya que es de este modo como son más ampliamente conocidas.

TITLE: “ENDOCANNABINOID SYSTEM IN ALCOHOLISM: PHISIOLOGYCAL AND THERAPEUTICAL IMPLICATIONS”

ABSTRACT

Various genetic, biochemical and pharmacological pieces of evidence indicate that the endocannabinoid system could be linked to alcoholism. However, various aspects of this relationship remain not fully documented. The results presented during this doctoral thesis give new insights into this topic. This work focused on two fundamental issues concerning the relationship between the endocannabinoid system and alcoholism: (i) the effects of alcohol consumption on the biochemistry of the endocannabinoid system and (ii) the therapeutic potential of a direct pharmacological action on the endocannabinoid system, through the use of cannabinoid agonists or antagonists, in the treatment of alcoholism.

Therefore, the experiments performed during this doctoral thesis have been classified into five distinct objectives. In the first two ones, we studied the effects of alcohol consumption on the cannabinoid system in rodents with a particular focus on distinct administration patterns: on the one hand, a short-term administration, and on the other hand, a chronic administration of alcohol whether on a continuous basis or alternating periods of alcohol exposure and withdrawal. The third objective deled with the analysis of central elements of the endogenous cannabinoid system, such as CB₁ receptors and the FAAH enzyme, in distinct post-mortem brain areas from alcohol patients whose death was due whether to suicide or to natural causes. The fourth objective more particularly deled with the potential therapeutic effects of the CB₁ antagonist, rimonabant, on the behavioural symptomatology associated to early alcohol abstinence with a particular focus on the neurochemical mechanisms implicated in the beneficial effects of this compound. In the last part of this work, we designed an *in vitro* model of alcohol/abstinence in pure cortical neuron cultures, in which we evaluated (i) the role of cannabinoids in the initiation of neuro-adaptations that take place in the early onset of alcohol tolerance and (ii) the possible neuroprotective effects of these compounds in the typical situation of enhanced neuron excitability that occurs during alcohol abstinence.

Several important pieces of data can be highlighted to summarize the results obtained during this doctoral thesis:

Concerning the acute administration of alcohol, we report here a general decrease in the content of endocannabinoids and NAEs in areas of the brain implicated in addiction, reward, motor control, intake and stress. Moreover, we suggest here that these reductions could parallel an increase in FAAH enzyme that would be responsible for a higher rate of degradation of these compounds. Finally, in the same conditions, we observed a reduction in the expression of CB₁ in some of the regions analysed, that could be considered as a form of adaptive mechanism in response to the reduced contents of endocannabinoid ligands. These different changes could be related to the behavioural effects related to acute alcohol consumption (such as motor discoordination, attention deficit, irritability) as well as the neuroadaptive events that occur at the onset of chronic alcohol consumption.

Our data show that the regimen of treatment (chronic *vs.* cycles of alcohol exposure and withdrawal) induced marked differences in the pattern of expression of the elements of the endogenous system. Our data could indicate that a discontinuous administration of alcohol would not enable the onset of sustained adaptive mechanisms related with the endocannabinoid system, unlike what is observed in the case of a chronic treatment. Furthermore, this could be related with the differences in neurotransmitter release (GABA, glutamate, dopamine) in function of the regimen of alcohol consumption that have previously been implicated in the excitotoxic processes that occur during alcohol withdrawal (Brown *et al.*, 1988; Booth y Blow, 1993; Becker , 1998; De Witte *et al.*, 2003). Finally, these data were partly confirmed by the results obtained from human post-mortem tissues, in which the expression of CB₁ and FAAH was also modified in a region-specific fashion.

The general focus of the next part was the study of the potential therapeutic properties of cannabinoids in alcoholism. First, we showed that the CB₁ antagonist, rimonabant, displayed an anxiolytic effect during alcohol abstinence in rats. This effect was related to changes in the levels of GABA, glutamate en dopamine, that overlap the characteristic deregulation of the inhibitory and excitatory systems which has been reported earlier (Koob y Le Moal, 2001; Weiss y Porrino, 2002; De Witte *et al.*, 2003). More importantly, we describe here that rimonabant treatment in abstinent animals was able to correct the changes in neurotransmitter release, an effect that likely explains its anxiolytic properties in the situation of abstinence.

In order to further characterize the effects of cannabinoid compounds in alcoholism, we have set-up a model of alcohol treatment and withdrawal *in vitro*, in which we studied the expression of the elements of the endocannabinoid system. While no

modification could be observed in the expression of CB₁ receptor or FAAH, we report here an increase in GABA receptor subunits $\alpha 1$ y $\beta 3$ and an important decrease in the NR2A subunit of the NMDA receptor. These changes could be directly related to the enhanced sensitivity to excitotoxic challenges that we describe here in our model during alcohol withdrawal. Furthermore, the treatment with the cannabinoid agonist, HU210, induced a sustained neuroprotective effect against NMDA-induced excitotoxicity, specifically during withdrawal conditions.

Overall, the data presented in this doctoral thesis highlight the central role of the endogenous cannabinoid system in the onset of the neuroadaptive mechanisms related to alcohol tolerance and to further excitotoxic processes with deleterious consequences to the brain.

I. INTRODUCCIÓN

1. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

1.1. Circuito de recompensa cerebral y drogas de abuso.....	1
1.2. El alcohol como droga de abuso.....	3
1.2.1. Farmacología del alcohol.....	3
1.2.2. Efectos del alcohol en la fisiología humana.....	5
1.2.3. Efectos del alcohol sobre el sistema nervioso central (SNC).....	5
1.2.3.1. Mecanismos de acción a nivel molecular del alcohol.....	5
1.2.3.2. Efectos agudos del alcohol.....	7
a) Sobre el sistema dopaminérgico.....	8
b) Sobre el sistema GABAérgico.....	9
c) Sobre el sistema glutamatérgico.....	10
d) Sobre el sistema opioide.....	12
e) Sobre el sistema serotoninérgico.....	13
d) Otros efectos.....	14
1.2.3.3. Tolerancia.....	14
1.2.3.4. Dependencia y abstinencia.....	17
1.2.3.5. Recaída.....	21
1.2.3.6. El alcoholismo como proceso neurodegenerativo.....	24

2. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

2.1. Introducción.....	26
2.2. Receptores cannabinoides.....	28
2.3. Ligandos cannabinoides y moléculas relacionadas.....	32
2.4. Metabolismo de los cannabinoides.....	36
2.5. Mecanismos de acción molecular de los cannabinoides en el SNC.....	39
2.6. Neuroprotección mediada por cannabinoides.....	42
2.7. Papel fisiológico del sistema endocannabinoide.....	43

2.8. Sistema endocannabinoide y circuito de recompensa.....	46
2.9. Acciones a nivel molecular de los cannabinoides sobre el circuito de recompensa.....	47
2.10. Alcohol y sistema cannabinoide endógeno.....	51
a) Evidencias genéticas.....	51
b) Evidencias bioquímicas.....	53
c) Evidencias farmacológicas.....	54
II. OBJETIVOS.....	60
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	63
- Animales de experimentación	
- Obtención de las muestras	
- Tratamientos farmacológicos	
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	73
2.1. Determinación de parámetros comportamentales.....	73
2.1.1. Análisis de actividad locomotora general: Tablero con agujeros	
2.1.2. Pruebas de ansiedad: Laberinto en cruz elevado	
2.2. Medida de neurotransmisores por HPLC.....	75
2.2.1. Preparación de los tejidos	
2.2.3. Valoración de los contenidos de GABA y glutamato	
2.2.4. Valoración de los contenidos de noradrenalina y dopamina	
2.2.5. Valoración de los contenidos de serotonina	
2.3. Medida de endocannabinoides por cromatografía líquida-espectrometría de masas.....	77
2.4. Análisis de unión específica al receptor CB ₁ mediante autorradiografía.....	79
2.5. Análisis de unión específica al receptor CB ₁ en fracción de membrana.....	81

2.6. Cuantificación de ARNm mediante hibridación <i>in situ</i>	82
2.7. Cultivos primarios de neuronas corticales y muerte neuronal inducida por excitotoxicidad.....	84
2.8. Análisis por <i>western-blot</i>	85
2.9. Determinación de la expresión de ARNm por qPCR.....	86
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	88
IV. RESULTADOS.....	91
V. DISCUSIÓN.....	113
VI. CONCLUSIONES.....	147
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	149

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. NEUROBIOLOGÍA DE LA ADICCIÓN

1.1. Circuito de recompensa cerebral y drogas de abuso

La adicción a drogas de abuso puede ser considerada como una enfermedad del sistema de recompensa cerebral (Vetulani, 2001). Las sustancias de abuso son capaces de modular este circuito, que es fundamental en el inicio y mantenimiento de los comportamientos que son importantes para la supervivencia tales como comer o la actividad sexual. El fascículo telencefálico medial, que conecta el área tegmental ventral con el núcleo accumbens, fueron las primeras estructuras identificadas en este sistema. También están implicadas en el circuito proyecciones procedentes del área tegmental ventral y el núcleo accumbens que inervan otras áreas límbicas (como la amígdala) y corticales del cerebro importantes para la expresión de las emociones, la reacción ante determinados estímulos, y la capacidad para hacer planes y establecer juicios (Tomkins y Sellers, 2001).

Aunque el fascículo telencefálico medial está formado por neuronas que contienen dopamina, serotonina y noradrenalina, es la proyección dopaminérgica la que ha sido clásicamente más implicada en el refuerzo. Así, los refuerzos tanto naturales (comida, sexo) como artificiales (drogas de abuso) activan esta vía (también conocida como “ruta mesocorticolímbica dopaminérgica”), produciéndose entonces un aumento de liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Tomkins y Sellers, 2001). Las neuronas dopaminérgicas son activadas por estímulos que conducen al animal a realizar o repetir un comportamiento determinado (estímulo motivacional) (Di Chiara, 1997). Desde el punto de vista evolutivo, el circuito de recompensa cerebral aumenta la supervivencia porque da prioridad a acciones esenciales para el ser vivo tales como la reproducción o la alimentación; globalmente, este sistema juega un papel esencial en los procesos cognitivos, de refuerzo y motivacionales (Lupica y Riegel, 2005). Sin embargo, las actividades placenteras naturales están controladas por mecanismos de *feedback* que activan los centros aversivos y que ponen fin a esos comportamientos, mientras que esas restricciones no aparecen en el caso de las drogas de abuso. Existen varios grupos de sustancias que activan el circuito de recompensa y que pueden conducir a la drogodependencia, que en humanos es una enfermedad crónica y recurrente, caracterizada por una pérdida absoluta sobre el control de la droga, y en la que el ansia, el deseo (en inglés, *craving*) del consumo de la sustancia es capaz de inhibir los demás comportamientos (Vetulani, 2001).

A pesar de la gran importancia que juega el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, en los últimos años se ha mostrado que las propiedades agudas reforzantes de varias drogas de abuso son independientes del sistema dopaminérgico, ya que roedores a los que se inactiva este sistema continúan mostrando refuerzo positivo tras la administración de alcohol, heroína y nicotina (Laviolette y Van der Kooy, 2003; Le Moal *et al.*, 1979; Pettit *et al.*, 1984; Rassnick *et al.*, 1993a, b). Actualmente hay consenso en admitir que la adicción, a nivel cerebral, es el producto de desregulaciones progresivas y de múltiples cambios fisiopatológicos en muchas estructuras y sistemas cerebrales, no solo del sistema dopaminérgico mesolímbico. Así, el circuito estriato-palidal-talámico participa en la transición de la motivación a la acción (Kelley, 2004; Mogenson *et al.*, 1980), mientras que la corteza prefrontal tiene un papel importante en la autorregulación del comportamiento y su patología en los problemas de autocontrol (Arnsten y Li, 2005; Dalley *et al.*, 2004; Miller y Cohen, 2001). Por otra parte, un aspecto primordial en la emoción y la motivación depende de la valoración de los estímulos ambientales externos. En esta valoración dependen áreas cerebrales interconectadas como la amígdala, el estriado ventral y la corteza prefrontal (Cardinal *et al.*, 2002). Además, los circuitos cerebrales del estrés están implicados en la vulnerabilidad inicial a las drogas de abuso, el refuerzo negativo asociado con la abstinencia -tanto aguda como tardía- y la recaída inducida por estrés (Goeders, 1997; Kreek y Koob, 1998; Piazza *et al.*, 1996; Piazza y Le Moal, 1997, 1998).

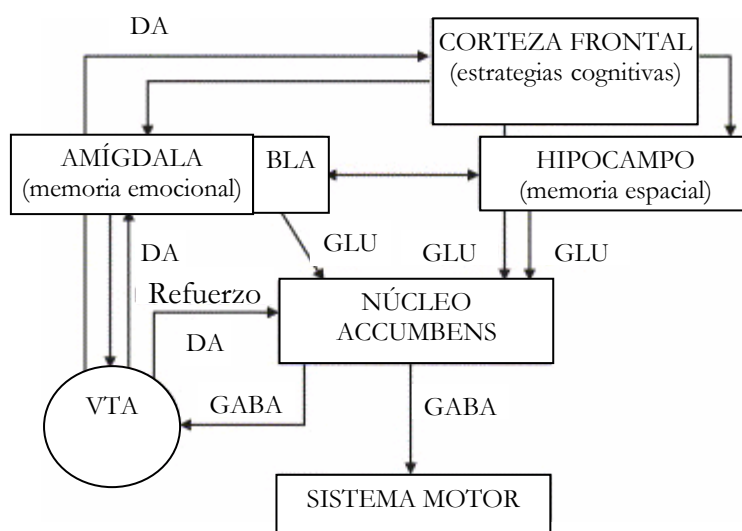


Figura 1. Esquema de las relaciones existentes entre distintas estructuras cerebrales: la corteza frontal, que elabora las estrategias cognitivas de los distintos comportamientos; la amígdala, que procesa las memorias afectivas; el hipocampo, principalmente implicado en la memoria; y el núcleo accumbens y el área tegmental ventral (VTA), reforzando el circuito de recompensa. Nótese que las vías ascendentes son principalmente dopaminérgicas (DA), mientras que las rutas descendentes son mayoritariamente glutamatérgicas (GLU) y GABAérgicas (GABA) (Tomado de De Witte, 2004).

En cuanto a los neurotransmisores implicados en la adicción a drogas de abuso, además de la dopamina, participan también de forma trascendental neurotransmisores como el GABA, la serotonina, la acetilcolina y la noradrenalina (Dachour y De Witte, 2000), neuropéptidos como el sistema de la pro-opiomelanocortina (POMC) (Wurst *et al.*, 2007) y otros opioides, el factor liberador de corticotropina (CRF), el neuropéptido Y (NPY) (Koob y Le Moal, 2001; Gallate, 2004) o los péptidos CART (*cocaine and amphetamine regulated transcript*) (Domínguez *et al.*, 2004), e incluso hormonas como ghrelina, prolactina, insulina y leptina (Figlewicz *et al.*, 2003, Wurst *et al.*, 2007).

1.2. El alcohol como droga de abuso

Dejando aparte la cafeína y la nicotina, el alcohol es, con mucho, la droga legal más comúnmente utilizada. El comportamiento adictivo asociado con el alcoholismo se caracteriza por una preocupación compulsiva por obtener alcohol, la pérdida de control sobre el consumo, y el desarrollo de tolerancia y dependencia, así como por un deterioro en las relaciones sociales y laborales. Como otros desórdenes adictivos, el alcoholismo lleva asociado una vulnerabilidad crónica a la recaída tras el cese del consumo de alcohol. Los motivos que conducen al consumo excesivo de alcohol en algunos individuos y no en otros son complejos, puesto que responden a las interacciones que se producen entre factores genéticos, psicosociales, ambientales y neurobiológicos (Vetulani, 2001; Weiss y Porrino, 2002; Le Moal y Koob, 2007).

1.2.1. Farmacología del alcohol

El alcohol etílico o etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es un líquido claro, incoloro, volátil, inflamable, hidrosoluble y liposoluble, aunque en menor proporción. Respecto a su valor nutritivo, 1 gramo de alcohol aporta al organismo 7,1 Kcal; sin embargo, este aporte energético no se acompaña de un aporte nutritivo, como minerales, proteínas o vitaminas. Aunque el responsable principal de las acciones es el alcohol, otros compuestos que están presentes en las bebidas alcohólicas pueden contribuir a aumentar el daño cuando se bebe en exceso; entre ellos se encuentran alcoholes de bajo peso molecular (metanol, butanol), aldehídos, ésteres, histamina, fenoles, taninos, hierro, plomo y cobalto (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

El alcohol se obtiene fundamentalmente de la fermentación anaeróbica de los hidratos de carbono, a través de la fermentación alcohólica. Una vez ingerido, aproximadamente el 25% es absorbido en el estómago, y el resto atraviesa las membranas del tracto gastrointestinal por difusión simple. En la velocidad de absorción influyen factores como la presencia de

alimentos en el estómago, la cantidad de alcohol ingerida y las características de la bebida consumida. Una vez absorbido, el alcohol se distribuye por todo el organismo, salvo por el tejido graso. El alcohol atraviesa con facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria; igualmente puede pasar a la leche materna (Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

Con respecto a su metabolismo, una parte del alcohol ingerido se metaboliza en el estómago, mediante la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH). Sin embargo, la mayor parte del alcohol absorbido es metabolizado en el hígado, donde sufre dos procesos oxidativos: en el primero, que tiene lugar en el citoplasma del hepatocito mediante la ADH, el etanol pasa a acetaldehído; en el segundo paso el acetaldehído se oxida a acetato. En una menor proporción el alcohol se oxida en los microsomas a través de una vía metabólica específica denominada “sistema oxidativo microsomal para la oxidación del etanol”. Las catalasas localizadas en los peroxisomas constituyen una tercera vía metabólica cuya importancia es escasa o nula.

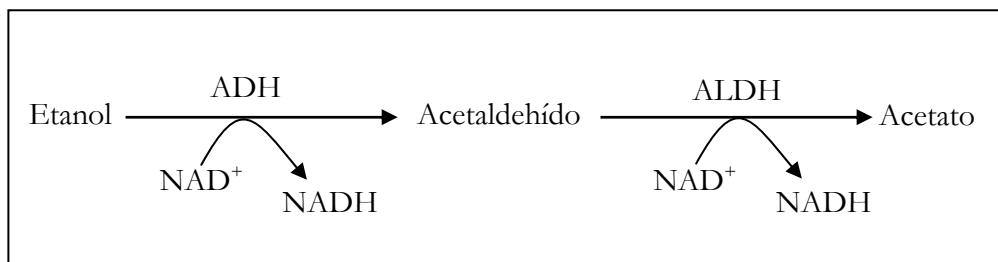


Figura 2: Esquema de la ruta catabólica del alcohol en el hígado. Las consecuencias de la oxidación del alcohol son un incremento en la producción de acetaldehído y un desequilibrio redox, ya que se produce nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH) a partir de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). El segundo paso oxidativo consiste en la formación de acetato a partir del acetaldehído, acción catalizada por una aldehído deshidrogenasa (ALDH) con el concurso también de NAD que se reduce a NADH. Por su parte, el acetato obtenido en el citoplasma del hepatocito es biotransformado en acetil-CoA mediante la acción de la enzima acetilCoA-sintetasa, localizada a nivel mitocondrial (Parés y Caballería, 2002).

Las enzimas ADH y ALDH presentan variantes genéticas, es decir, se han encontrado varios polimorfismos genéticos que son expresados de manera diferente en los distintos grupos raciales. Así, en algunos estudios étnicos se ha observado que un 40% de los orientales poseen formas (isozimas) de ADH más funcionales, es decir, capaces de catabolizar el etanol de forma más rápida, lo que lleva consigo mayores y más rápidas acumulaciones de acetaldehído. El acetaldehído es tóxico, por lo que en estas personas produce un efecto aversivo, evitando que el sujeto beba en exceso. De este hecho se podría desprender que la

forma inactiva de la ADH tendría un efecto disuasorio del consumo de alcohol (Thomasson *et al.* 1994; Chen *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 1997; Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

1.2.2. Efectos del alcohol en la fisiología humana

El etanol es tóxico para la mayoría de tejidos del organismo. Su consumo crónico y excesivo se ha asociado no solo al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, sino también a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden acabar con la vida de los sujetos que las sufren. El paradigma de las lesiones orgánicas producidas por el consumo crónico de etanol es la cirrosis hepática. La mayoría de las lesiones hepáticas por alcohol suelen iniciarse en forma de esteatosis hepática, para progresar posteriormente a una hepatitis alcohólica, una cirrosis hepática e incluso un carcinoma primitivo de hígado. De todos modos, las enfermedades producidas por el consumo crónico de alcohol afectan a casi todos los tejidos y sistemas del organismo. Así, tiene efectos graves sobre el sistema cardiovascular (miocardiopatía alcohólica), páncreas (pancreatitis aguda y crónica), sistema nervioso central (atrofia cerebral y cerebelosa, encefalopatías), nervios periféricos (polineuropatía alcohólica), sistema músculo-esquelético (osteoporosis, miopatía alcohólica) y sobre el feto (síndrome alcohólico fetal). También pueden aparecer, como consecuencia del consumo excesivo crónico de alcohol, enfermedades psicoorgánicas (amnesia lacunar, demencia alcohólica), trastornos psicóticos u otras enfermedades psiquiátricas como ansiedad y depresión. El desarrollo de estas lesiones depende en gran medida de la cantidad de alcohol consumido por los pacientes (dosis total acumulada de alcohol durante toda la vida del sujeto), aunque también influye una cierta predisposición personal (vulnerabilidad genética) y/o el concurso de determinadas circunstancias ambientales como malnutrición o infecciones concomitantes, como, por ejemplo, las producidas por los virus de la hepatitis B y C (Estruch, 2002).

1.2.3. Efectos del alcohol sobre el sistema nervioso central (SNC)

1.2.3.1. Mecanismos de acción a nivel molecular del alcohol

A diferencia de las demás sustancias de abuso, el alcohol no ejerce sus efectos psicotrópicos a través de su unión a un receptor específico, sino que es capaz de modificar, a nivel de la membrana neuronal, la permeabilidad de algunos canales iónicos y la funcionalidad de determinados receptores particularmente sensibles a la acción del alcohol. Los efectos psicotrópicos percibidos tras el consumo de alcohol resultan por tanto de la suma de estas acciones (Colombo, 1997).

El etanol es una droga débil; se necesitan decenas de gramos para producir un efecto farmacológico (en contra de lo que ocurre con la mayoría de las drogas de abuso, que actúan en el cuerpo a dosis de miligramos o microgramos por kilogramo). Su molécula no posee un carbono asimétrico, por lo que, como ya se ha mencionado, su interacción con los sustratos biológicos no es estereoselectiva. La complejidad y multitud de efectos que produce el etanol contrasta paradójicamente con la simplicidad de su estructura química. El grupo hidroxilo forma un dipolo en la molécula que favorece la formación de puentes de hidrógeno (o la ruptura de otros ya existentes) con proteínas o con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana. Es la formación de puentes de hidrógeno lo que hace a la molécula soluble en agua en todas las proporciones, y lo que la hace capaz de modificar la organización de moléculas acuosas en la matriz extracelular, pudiendo alterar de este modo la solubilidad de ligandos o iones que interaccionan con receptores de membrana. El etanol, además, es capaz de producir una perturbación de la arquitectura de la membrana por la alteración del orden o la composición de los lípidos situados dentro de la bicapa lipídica, o por la modificación de la estructura de los fosfolípidos dentro del microdominio proteína-lípido que mantiene la arquitectura de la proteína. Por el contrario, aunque el etanol puede localizarse también sobre la superficie externa de la membrana e interaccionar con las cabezas polares de los fosfolípidos, este tipo de interacciones producen pequeños efectos y solamente ocurren a altas concentraciones de alcohol (>100 mM). En cualquier caso, la alteración de la fluidez de la membrana neuronal que produce el etanol no parece ser responsable de los efectos más significativos de esta droga, ya que no sirve para explicar las acciones etílicas más características, como la intoxicación etílica, los *blackouts* (pérdidas de memoria prolongadas durante las borracheras), gran parte de la tolerancia y la hiperexcitabilidad característica del síndrome de abstinencia (Ayesta, 2002). Sin embargo, sí que parecen ser mucho más importantes las interacciones con la estructura aminoacídica de las proteínas, que ocurren a concentraciones más bajas de alcohol (10-50 mM), y que se producen dentro de los “bolsillos hidrofóbicos” situados en los dominios agua-proteína. Estos sitios pueden encontrarse cerca de la interfase agua-lípido, como ocurre con los receptores para GABA de tipo A (GABA_A), pueden también situarse en alguna zona del poro del receptor por donde pasan los iones, como ocurre en el caso del receptor NMDA, o por último, pueden localizarse en sitios de modulación alostérica del receptor, en el dominio extracelular amino terminal, donde se encuentre el sitio de reconocimiento del ligando endógeno, como ocurre en el caso del receptor para acetilcolina (Fadda y Rossetti, 1998).

Como se ve, los efectos farmacológicos del etanol son, por una parte, no selectivos, puesto que se pueden ver afectadas no solo la organización de la membrana y la función de las enzimas ligadas a ella, sino también la de las enzimas y proteínas implicadas en la transducción de señales, de canales iónicos, ionóforos acoplados a receptores y proteínas transportadoras, al igual que también se puede ver afectada la expresión génica. Sin embargo, por otra parte los efectos del etanol se pueden también considerar como específicos, puesto que la molécula interacciona con sitios discretos de cada proteína en particular, que son críticos para la función de la proteína y el funcionamiento celular (Fadda y Rossetti, 1998).

Por tanto, el etanol es capaz de influenciar la función de la mayoría, si no todos, los sistemas neuronales, a nivel molecular, celular, y sistémico. Debido a la reversibilidad de la interacción entre el etanol y las moléculas biológicas, las alteraciones en la función cerebral asociadas con el consumo crónico de alcohol son el resultado de las modificaciones plásticas (adaptativas) que tienen lugar en el cerebro en respuesta a los efectos del etanol, más que del efecto directo de la droga sobre un sustrato particular. Estos cambios pueden ser de corta o larga duración, pero reversibles, o bien ser permanentes y asociados a procesos degenerativos en determinadas áreas cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Una de las cuestiones más relevantes que se plantea al estudiar las modificaciones provocadas por el alcohol a tan distintos niveles es si el etanol actúa directamente sobre los neurotransmisores y sus receptores, o si ejerce sus acciones indirectamente, alterando el fino equilibrio de neurotransmisión en el cerebro. El cerebro es una red de sistemas de neurotransmisión, y la mayoría de los neurotransmisores están ligados a los demás ya sea porque comparten una misma ruta metabólica (como es el caso del GABA y el glutamato) o bien por sus conexiones neuronales (por ejemplo, GABA-glutamato-dopamina; ver figura 1); también porque comparten, en muchos casos, proteínas G y otras rutas de señalización a nivel de los mecanismos moleculares a los que están acoplados sus receptores. Todos estos sistemas actúan siempre en equilibrio, de modo que si un sistema se altera, el desequilibrio aparecerá en todos los demás.

1.2.3.2. Efectos agudos del alcohol

Con respecto a la neurobiología de los efectos reforzantes que el alcohol produce tras una exposición aguda se puede concluir que estos efectos se producen como consecuencia de su capacidad de modular la actividad y el funcionamiento de varios sistemas de neurotransmisión y neuromodulación.

a) Sobre el sistema dopaminérgico

Puesto que el etanol actúa como un reforzante positivo, una parte de la investigación se ha centrado en el estudio de su acción sobre la función dopaminérgica del área tegmental ventral en la ruta de recompensa mesocorticolímbica de la que se ha hablado previamente. El etanol aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Gessa *et al.*, 1985) y la liberación de dopamina en los terminales donde llegan estas neuronas, por lo que, como la mayoría de las drogas de abuso, es capaz de producir un aumento en la concentración de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara e Imperato, 1988). Este efecto excitatorio sobre las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral no está mediado por un cambio en la transmisión sináptica, sino que se produce por la acción del etanol directamente sobre estas neuronas (Diana *et al.*, 2003).

Otros estudios llevados a cabo para analizar el papel de la dopamina en las propiedades reforzantes del alcohol han mostrado que la microinyección de etanol en el área tegmental ventral sostiene la autoadministración de alcohol; asimismo el etanol aumenta, de forma dosis-dependiente, la liberación de dopamina en el núcleo accumbens en ratas que se autoadministran alcohol. Por otra parte, el bloqueo farmacológico o genético de la transmisión dopaminérgica también ha puesto de manifiesto el papel de la dopamina en las acciones reforzantes del etanol (Weiss y Porrino, 2002). Se ha observado que los animales *knockout* para los receptores D₁ o D₂ consumen menos etanol y muestran menor condicionamiento preferencial de plaza (*conditioned place preference*, o CPP) inducido por el etanol (Cunningham *et al.*, 2000, Risinger *et al.*, 2000).

Sin embargo, estudios realizados con animales a los que se provoca una lesión en la vía dopaminérgica mesolímbica (el núcleo accumbens queda denervado), a través de la inyección de 6-hidroxidopamina, han mostrado que esta denervación no interfiere con el consumo de alcohol ni con las respuestas inducidas por el refuerzo del etanol (Ikemoto *et al.*, 1997; Koistinen *et al.*, 2001). Del mismo modo, la elevación de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens por la administración de un inhibidor selectivo de la recaptación de dopamina no se ha mostrado capaz de alterar la autoadministración de alcohol (Engleman *et al.*, 2000). Esto demuestra que la autoadministración de etanol no depende de la activación del núcleo accumbens por la dopamina (Weiss y Porrino, 2002; Le Moal y Koob, 2007).

Posiblemente la estimulación de la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens sea necesaria para los efectos reforzantes asociados con las acciones estimulantes del alcohol a dosis bajas, pero no sea esencial para otros aspectos que también forman parte de las acciones reforzantes del alcohol, como por ejemplo su efecto ansiolítico (Weiss y Porrino, 2002).

b) Sobre el sistema GABAérgico

El ácido γ -amino butírico o GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. El sistema GABAérgico juega un papel muy importante en los efectos comportamentales y farmacológicos del etanol. Los receptores GABA_A son proteínas transmembrana formadas por heteropentámeros organizados a partir de subunidades que pueden pertenecer a alguna de las siete clases distintas que se han descrito: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , y π (Marutha Ravindran y Ticku, 2006b). En estos receptores, un ionóforo para el ion cloruro forma parte del receptor GABA_A. Además, presenta sitios de unión para benzodiazepinas, picrotoxina y barbitúricos. Los sitios de unión para benzodiazepinas y para barbitúricos ejercen una interacción alostérica positiva en el receptor GABA_A, es decir, son capaces de aumentar la capacidad de unión del GABA a su sitio de unión en el receptor GABA_A y la función del ionóforo, lo que conduce a una mayor hiperpolarización de la membrana.

En contraste con el complejo formado por el receptor GABA_A y el ionóforo de cloruro, el receptor GABA_B, está asociado a una proteína G sensible a la toxina pertussis. Mientras que la activación del receptor GABA_A produce una inhibición (pre- o postsináptica) a través de la modulación de la conductancia del cloruro, los receptores GABA_B están acoplados a canales de calcio o de potasio (pre- o postsinápticos, respectivamente) que, al abrirse, dejan salir a estos iones del citoplasma celular, de modo que se produce la inhibición neuronal. Los receptores GABA_B están presentes en menor número en el SNC, si se comparan con los receptores GABA_A. Se ha sugerido que el receptor GABA_B podría participar en la inhibición de la liberación de aminas, aminoácidos excitatorios, péptidos, hormonas y el propio GABA (Smith *et al.*, 1999).

Las acciones que el alcohol ejerce sobre los receptores GABAérgicos han sido especialmente implicadas en sus propiedades reforzantes. Las acciones *in vitro* del etanol sobre el receptor GABA_A, alterando las corrientes iónicas que pasan a su través, son uno de sus efectos más potentes (dosis tan bajas como 1-3 mM) (Koob, 2003). Existen asimismo evidencias que apoyan la idea de que, al menos en parte, los efectos comportamentales y cognitivos del etanol están mediados a través de la potenciación de la inhibición sináptica mediada por el receptor GABA_A (Ariwodola y Weiner, 2004). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los estudios sugieren que el etanol aumenta la neurotransmisión GABAérgica a través de la potenciación alostérica directa de los receptores postsinápticos GABA_A, también se han descrito otros mecanismos de acción sobre estos receptores: mecanismos de fosforilación/desfosforilación del receptor, así como sistemas de fosforilación de segundos

mensajeros que pueden, directa o indirectamente, modular la función del receptor (Chandler *et al.*, 1998).

Por otra parte, uno de los fármacos más empleados *in vivo* en los estudios preclínicos y clínicos relacionados con la dependencia a drogas de abuso es el baclofén, agonista del receptor GABA_B. Se ha descrito que los agonistas de este receptor son capaces de reducir la autoadministración de varias drogas de abuso, incluyendo cocaína, heroína, nicotina y alcohol (Besheer *et al.*, 2004). Con respecto a sus acciones específicas sobre el alcohol en ratas, se ha observado que el baclofén provoca una reducción en el consumo de etanol bajo diversos protocolos de experimentación, como por ejemplo en los tests de “libre elección” (Colombo *et al.*, 2000, 2002b), de “acceso limitado al alcohol” (Stromberg, 2004) y de autoadministración operante (Anstrom *et al.*, 2003, Colombo *et al.*, 2003, Besheer *et al.*, 2004). Asimismo, el baclofén se ha descrito como un fármaco capaz de disminuir las propiedades reforzantes y motivacionales del alcohol, como se ha puesto de manifiesto al realizar experimentos de “*extinction responding*” (Colombo *et al.*, 2003). En lo que se refiere a los estudios realizados en humanos, estudios preclínicos preliminares han mostrado que el baclofén es capaz de reducir el deseo de beber (*craving*) en pacientes alcohólicos (Addolorato *et al.*, 2000, 2002).

c) Sobre el sistema glutamatérgico

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, y actualmente se sabe que juega un importante papel en el alcoholismo. Los receptores glutamatérgicos en el SNC se dividen en ionotrópicos –forman un canal iónico– (NMDA, AMPA y kainato) y metabotrópicos –acoplados a proteínas G–. Las acciones del alcohol sobre el sistema glutamatérgico se basan en su capacidad para modificar la actividad de los receptores ionotrópicos para glutamato, tanto de los receptores AMPA/kainato como de los receptores de tipo NMDA, si bien los efectos del etanol sobre los receptores no-NMDA han sido peor descritos que los que produce sobre los receptores de tipo NMDA (Dodd *et al.*, 2000).

La acción del etanol sobre los receptores AMPA/kainato requiere dosis más altas de las que se necesitan para inhibir los receptores NMDA (Hoffman *et al.*, 1989, Lovinger *et al.*, 1989). Además, se ha sugerido que existen diferentes subtipos de receptores de tipo kainato que presentan distinta sensibilidad al alcohol, debido a la distinta configuración de sus subunidades (Gonzales y Jaworski, 1997).

Por su parte, el receptor NMDA es permeable al calcio, sodio y potasio, y ha sido implicado en múltiples procesos tanto fisiológicos (plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria), como patológicos (ataques epilépticos y neurotoxicidad). Estos receptores están compuestos por dos tipos de subunidades, NR1 y NR2 (NR2A-D), formando tetrámeros.

Cada receptor está siempre formado por dos subunidades NR1 y dos de las subunidades NR2 (Ishii *et al.*, 1993; Monyer *et al.*, 1992). Las distintas subunidades NR2 varían en cuanto a su composición aminoacídica, sus propiedades farmacológicas y su distribución en el cerebro adulto (Magnusson *et al.* 2002; Sah y Lopez De Armentia 2003). De este modo, la composición de las subunidades del receptor NMDA determinará sus características fisiológicas, entre ellas, su sensibilidad al etanol. Se ha descrito que los receptores que contienen subunidades NR2A y NR2B son más sensibles al etanol que los que contienen subunidades NR2C o NR2D (Masood *et al.* 1994; Mirshahi y Woodward 1995).

Los estudios bioquímicos realizados acerca de la acción del etanol sobre los receptores NMDA han puesto de manifiesto que una dosis tan baja como el 0.03% es capaz de inhibir el flujo iónico que pasa a través de estos receptores (Lovinger *et al.*, 1989); esto es muy significativo, puesto que se trata de dosis que se alcanzan fácilmente en el consumo humano. Se ha descrito también que la liberación postsináptica de neurotransmisores tales como dopamina, noradrenalina y acetilcolina inducida por la activación del receptor NMDA puede verse interferida por la acción del etanol (Gonzales y Jaworski, 1997).

Por otra parte, los análisis electrofisiológicos han mostrado que el alcohol reduce las señales eléctricas excitatorias evocadas por los receptores NMDA; esta menor actividad eléctrica ayudaría a explicar la menor liberación de neurotransmisores en respuesta a la activación del receptor NMDA anteriormente mencionada. La convergencia entre los resultados bioquímicos y electrofisiológicos apoya la hipótesis de que la inhibición de la transmisión glutamatérgica representa uno de los principales mecanismos moleculares que subyacen a las acciones del alcohol en el cerebro (Gonzales y Jaworski, 1997).

No obstante, el sitio de acción preciso del etanol sobre el receptor NMDA es aún desconocido. Se cree que la inhibición de la función de este receptor no está mediada por la competición directa por los sitios de unión en el canal, puesto que el etanol no compite por los sitios de unión del NMDA, del magnesio (que actúa bloqueando el poro cuando el receptor no está activado), ni de las poliaminas; con todo, es capaz de modificar la cinética de apertura del canal. Puesto que la naturaleza de la interacción del etanol no envuelve mecanismos competitivos, se ha propuesto que el etanol y otros n-alcoholes se unan a un bolsillo hidrofóbico del canal y provoquen de esta forma la modificación de la conductancia a los iones (Dodd *et al.*, 2000).

Asimismo, el etanol presenta otros mecanismos de acción además de su acción directa sobre el receptor NMDA: la fosforilación/desfosforilación del receptor, así como los sistemas de fosforilación de segundos mensajeros capaces de modular, directa o indirectamente, la

función del receptor, pueden verse perturbados por el etanol. Estos mecanismos de acción del alcohol han sido también propuestos para el receptor GABA_A (Chandler *et al.*, 1998).

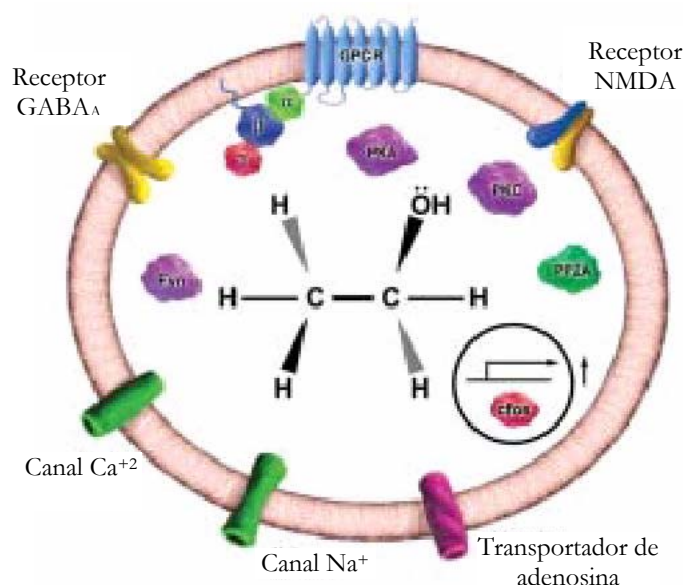


Figura 3. El etanol es capaz de alterar la función de múltiples componentes celulares. En la figura se representan la fórmula estructural de la molécula de etanol (centro) y ejemplos de algunas de sus dianas proteicas directas e indirectas. Entre éstas se incluyen canales iónicos abiertos por ligando (receptores NMDA y GABA_A); canales iónicos dependientes de voltaje (como los de calcio y potasio); el transportador de adenosina; kinasas como la proteín-quinasa A (PKA), la proteín-quinasa C (PKC) y Fyn, y factores de transcripción como c-fos (Tomado de Ron, 2004).

d) Sobre el sistema opioide

Los péptidos opioides han sido clásicamente implicados en las propiedades reforzantes agudas del alcohol. Los estudios con antagonistas de los receptores opioides, tanto los generales (naloxona y naltrexona, por ejemplo) como los selectivos para los receptores μ - o δ -opioide, han mostrado que estos compuestos son capaces de disminuir la autoadministración en roedores bajo varios procedimientos experimentales (Froehlich, 1997). Los resultados obtenidos con ratones *knock-out* para el receptor μ -opioide sugieren que este receptor se encuentra principalmente implicado en el refuerzo del etanol, mientras que los encontrados con ratones *knock-out* para el receptor de tipo δ apuntan a una participación de estos receptores en la disminución del estado de ansiedad incrementado que presentan estos ratones (Weiss y Porrino, 2002).

La participación del sistema opioide en la adicción al alcohol no ha sido del todo definida, aunque se sabe que interfiere en la transmisión dopaminérgica en el núcleo

accumbens, pero que hay además implicados otros efectos que son independientes de la dopamina. El etanol aumenta los niveles de endorfinas en el núcleo accumbens, lo que sugiere que la atenuación de las propiedades reforzantes del alcohol por antagonistas opioides podría estar relacionada con la inhibición de las acciones endógenas de las endorfinas en el núcleo accumbens (Olive *et al.*, 2001). Sin embargo, estos efectos deben ser también dependientes de las interacciones con los mecanismos dopaminérgicos, puesto que la administración de antagonistas opioides disminuye la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por etanol (Gonzales y Weiss, 1998). Por otra parte, las lesiones selectivas de los terminales dopaminérgicos en el núcleo accumbens no alteran la autoadministración de etanol en ratas, mientras que la naltrexona sí es capaz de reducir el consumo de alcohol en estos mismos animales (Koistinen *et al.*, 2001). Como se ve, participan otros mecanismos que no afectan a la transmisión dopaminérgica y que contribuyen a los efectos supresores de los antagonistas opioides sobre el consumo de alcohol (Weiss y Porrino, 2002).

e) Sobre el sistema serotoninérgico

Las vías serotoninérgicas se originan en los núcleos del rafe, situados en el tallo cerebral, y proyectan a numerosas áreas corticales y subcorticales del cerebro. La extensa innervación serotoninérgica lleva asociada, consecuentemente, una multitud de funciones moduladas por este neurotransmisor, y explica la variedad de desórdenes psiquiátricos con los que se ha relacionado la disfunción serotoninérgica (Heinz *et al.*, 2001). Dicha disfunción ha sido implicada también en la patogénesis y el mantenimiento del consumo excesivo de alcohol así como en la dependencia al alcohol, es decir, se hipotetiza que existe una relación inversa entre el tono serotoninérgico cerebral y el consumo de alcohol (bajos niveles de serotonina se correlacionan con alto consumo de alcohol) (Keläi *et al.*, 2003).

El etanol es capaz de potenciar la acción de la serotonina sobre los receptores 5-HT₃ (Lovinger, 1997), así como sobre los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}. Asimismo, se ha visto que el alcohol provoca un aumento de los niveles extracelulares de serotonina en el núcleo accumbens, la corteza frontal, y el hipocampo ventral (Thielen *et al.*, 2001). Por último, en varios modelos de roedores con alta preferencia por el alcohol se ha descrito que los niveles tisulares de serotonina se encuentran reducidos y que presentan menor densidad de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}, pero mayor número de receptores 5-HT_{1A} en la corteza prefrontal medial (Langen *et al.*, 2002).

Los estudios farmacológicos han puesto de manifiesto que los compuestos que actúan aumentando la disponibilidad sináptica de serotonina (por ejemplo, a través de un incremento en los niveles de precursores serotoninérgicos, o a través del bloqueo de la recaptación de

serotonina) son capaces de disminuir el consumo de alcohol. Por su parte, los antagonistas de varios tipos de receptores serotoninérgicos son también capaces de disminuir la autoadministración de etanol. En particular, los antagonistas del receptor 5-HT₃ reducen la autoadministración de alcohol, mientras que los antagonistas de los receptores 5-HT₂ (incluyendo fármacos capaces de antagonizar no solo a los receptores 5-HT₂ sino también a los ya mencionados autorreceptores 5-HT_{1A}) producen selectivamente una reducción del refuerzo agudo del alcohol (Koob, 2003).

Con respecto a los estudios con animales *knock-out*, se han llevado a cabo experimentos con ratones *knock-out* para el receptor 5-HT_{1B}, observándose que estos animales muestran una menor intoxicación en respuesta a una sola dosis de alcohol, cuando se les compara con los animales *wild-type*, lo que indica que este receptor se encuentra implicado en la intoxicación aguda por alcohol (Lovinger, 1997).

d) Otros efectos

Gran parte de los canales iónicos pueden ser modulados por el etanol. Entre ellos destacan los canales de calcio: por un mecanismo que se desconoce, la administración aguda de etanol actúa sobre los canales de calcio tipo N, tipo T y, especialmente, sobre los de tipo L, inhibiendo su función (Ayesta, 2002). También los receptores nicotínicos de acetilcolina se ven afectados por el alcohol, viendo inhibida su función (Forman y Miller, 1989). A nivel de segundos mensajeros, se ha descrito que la proteína quinasa C está implicada en muchas de las respuestas celulares del etanol, regulando la sensibilidad al etanol de diversos canales y receptores. El alcohol parece potenciar también la producción de AMPc mediada por receptores, lo que podría explicar parte de sus efectos intracelulares. La adenosina parece mediar en muchos de los efectos que el etanol ejerce sobre el AMPc; la acción del etanol sobre la adenosina parece realizarse tanto a nivel de receptores adenosínicos como a nivel de uno de los transportadores de la adenosina (Ayesta, 2002). Por último, también factores de transcripción como c-fos y CREB parecen verse afectados por el etanol (Ayesta, 2002; Wallner *et al.*, 2006).

1.2.3.3. Tolerancia

El uso continuado del alcohol se apoya en las sensaciones de refuerzo positivo que son experimentadas tras su consumo. Sin embargo, debido al desarrollo de tolerancia, la euforia asociada con el consumo de alcohol disminuye con el paso del tiempo, e incluso pasa a convertirse en un refuerzo negativo a partir del mismo momento en que el alcohol empieza a ser consumido para aliviar los síntomas del síndrome de abstinencia (Valdez y Koob, 2004).

El desarrollo de tolerancia tras la ingesta crónica de alcohol podría ser consecuencia de algunos cambios neuroadaptativos en el cerebro que conducirían, en último lugar, a la dependencia. Estos cambios podrían producirse en alguno de los múltiples mecanismos que se activan desde que la droga es administrada hasta la aparición de sus efectos farmacológicos (Fadda y Rossetti, 1998). Dentro de estos mecanismos, las alteraciones en la función sináptica (en la plasticidad sináptica) han sido uno de los aspectos más estudiados, y en particular, los cambios compensatorios en los receptores NMDA y GABA_A que probablemente contribuyan al desarrollo de la tolerancia al etanol (Chandler *et al.*, 1998).

La tolerancia aguda al etanol puede ser de especial importancia para determinar la sensibilidad inicial de un individuo a los efectos intoxicantes del alcohol (Schuckit y Smith, 1996). Se cree que están implicados los receptores NMDA y GABA_A; la rapidez de los cambios que se dan durante este proceso excluye la implicación de procesos transcripcionales, y sugiere más bien la modulación de la función del receptor por parte del sistema de segundos mensajeros (participación de tirosina-quinasa y tirosina-fosfatasas en el caso del receptor NMDA, y de la proteína quinasa C en el caso del receptor GABA_A), es decir, en este momento se producen modificaciones solamente a nivel post-transduccional (Chandler *et al.*, 1998).

Por su parte, la tolerancia crónica al alcohol se caracteriza, entre otras cosas, por una reducción de la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA, y un aumento en la transmisión excitatoria mediada por glutamato. Se cree que los mecanismos que subyacen a estos fenómenos son, por una parte, cambios funcionales que se producen en los receptores NMDA y GABA_A, ya que la exposición prolongada al alcohol conduce a la sensibilización de los procesos mediados por el receptor NMDA, incluyendo el flujo de calcio y los procesos dependientes de calcio como la excitotoxicidad y la formación de óxido nítrico. Asimismo, se ha descrito que el flujo de cloruro acoplado al receptor GABA_A, incrementado por la administración aguda de etanol, se ve disminuido tras la exposición crónica (Mhatre y Ticku, 1994; Devaud *et al.*, 1995). Se ha propuesto que estos procesos sean debidos a cambios en la constitución de las subunidades de los receptores y a procesos de *splicing* alternativo. Por otra parte, se ha sugerido también que los cambios en la transmisión de estos neurotransmisores podrían estar causados por modificaciones en la densidad de los receptores mencionados, es decir, por fenómenos de *up-* y *down-regulation*. En el caso del receptor GABA_A, la mayoría de los estudios sugieren que no hay cambios en la densidad de los receptores tras la exposición crónica al etanol, sino que se produciría más bien un cambio en la expresión de las subunidades que lo conforman (Chandler *et al.*, 1998, De Witte *et al.*, 2003). Así, se ha descrito un aumento en la expresión de las subunidades γ_1 (Devaud *et al.*, 1995), α_4 (Devaud *et al.*,

1995; Sheela Rani y Ticku, 2006), α_6 (Mhatre y Ticku, 1992), β_1 , β_2 y β_3 (Mhatre y Ticku, 1994) tras la exposición crónica a alcohol tanto en cultivos primarios de neuronas como en diversas áreas cerebrales de ratón, mientras que la expresión de las subunidades α_1 , α_2 (Mhatre *et al.*, 1993; Sheela Rani y Ticku, 2006), α_3 , α_5 (Mhatre *et al.*, 1993) y γ_2 (Sheela Rani y Ticku, 2006) disminuye.

En cuanto al receptor NMDA, numerosos estudios indican que el tratamiento crónico con dosis intoxicantes de etanol provoca un aumento en la función de estos receptores, aunque hay cierta controversia acerca de la base celular de este fenómeno. Algunos estudios han descrito aumentos en la expresión de proteína y/o ARNm de las subunidades del receptor NMDA, sobretodo NR2B (Hu *et al.*, 1996; Kumari y Ticku, 1998; Marutha Ravindran y Ticku, 2004; Sheela Rani y Ticku, 2006), mientras que otros han mostrado un aumento en la función del receptor NMDA sin que aparezcan cambios en la densidad de receptores (Chandler *et al.*, 1997; Rudolph *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2001). También se ha sugerido que la exposición al alcohol de forma crónica podría inducir alteraciones en el tráfico sináptico de estos receptores (Carpenter-Hyland *et al.*, 2004). Todas estas alteraciones son consideradas la respuesta neuroadaptativa provocada por el bloqueo crónico de los receptores NMDA por el etanol y contribuyen a la hiperexcitabilidad y la excitotoxicidad asociada con la abstinencia tras periodos prolongados de exposición al alcohol (Thomas y Morriset, 2000; Carpenter-Hyland *et al.*, 2004).

Es importante señalar el hecho de que distintos patrones de administración de alcohol parecen provocar cambios distintos sobre la expresión de las subunidades de los receptores GABA_A y NMDA. Así, se ha descrito que un patrón intermitente de administración de alcohol tiene efectos menos pronunciados sobre la expresión del receptor GABA_A, pero aumenta los niveles de expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA de forma más dramática que una exposición crónica en cultivos de neuronas corticales (Sheela Rani y Ticku, 2006).

Entre los mecanismos que median la tolerancia crónica al alcohol también se ha propuesto la participación de los sistemas de segundos mensajeros, en particular de la fosforilación de los receptores NMDA y GABA_A por parte de quinasas tipo C (PKC) y A (PKA) y la enzima calcio-calmodulina quinasa de tipo II (Chandler *et al.*, 1998). Además, tanto la exposición crónica como intermitente al alcohol modulan la fosforilación de los receptores GABA_A por tirosina quinasas (Marutha Ravindran y Ticku, 2006a y 2006b). Por otra parte, se sabe que el etanol es capaz de inhibir la fosforilación de los receptores GABA_A por la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Kalluri y Ticku, 2002a) y podría también modular estos receptores a través de la inhibición de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK)

(Kalluri y Ticku, 2002b). Por último, se ha propuesto también que la modificación de la agrupación de los receptores y su distribución subcelular podrían ser mecanismos potenciales que también podrían provocar los cambios en la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria en el cerebro tras la exposición crónica al alcohol (Chandler *et al.*, 1998).

Por lo que respecta a otros sistemas de neurotransmisión, se ha descrito que el consumo crónico de alcohol determina una hiperactividad de las neuronas noradrenérgicas cerebrales, probablemente debida a una baja funcionalidad de los receptores presinápticos de tipo α_2 . Este fenómeno se manifiesta también durante las primeras horas de la interrupción del consumo, contribuyendo por tanto a la aparición de síntomas de abstinencia (Colombo, 1997).

Por último, la desregulación en el balance excitación/inhibición que se produce tras el consumo crónico de alcohol también parece estar mediada por canales de calcio, tanto los que se encuentran acoplados a receptores como los que son dependientes de voltaje. Durante la tolerancia y la abstinencia se produce un incremento adaptativo de estos canales, lo que conduce a la ya mencionada hiperexcitabilidad neuronal (De Witte *et al.*, 2003).

1.2.3.4. Dependencia y abstinencia

No existe un criterio aceptado universalmente acerca de lo que significa la dependencia en animales de laboratorio, como, en cierta forma, también ocurre en humanos. Además, aparecen limitaciones obvias a la hora de aplicar a los animales de laboratorio ciertos criterios humanos sobre la dependencia, por ejemplo cuando se tratan conceptos como el control sobre el consumo de alcohol. Muchos humanos que dicen tener problemas con la bebida no presentan síntomas físicos de dependencia (Gallate, 2004). Sin embargo, otros autores defienden que la abstinencia se encuentra en el centro de la dependencia al alcohol, y sostienen que no ocurre una dependencia real al alcohol si no se presentan síntomas de abstinencia (De Witte *et al.*, 2003). Actualmente se considera que la dependencia es una patología “continua” y no “binaria”, en el sentido de que la dependencia se puede presentar en diversos grados (Gallate, 2004).

La dependencia al alcohol es el resultado de las modificaciones con las que algunos sistemas de neurotransmisión se adaptan a la presencia continua de altas concentraciones de etanol, en un intento por normalizar la función cerebral sometida constantemente al daño del alcohol (De Witte *et al.*, 2003). Las modificaciones debidas a la ingesta crónica de alcohol son generalmente opuestas a las que produce su administración aguda. Una vez que se interrumpe el consumo de alcohol, su concentración en el cerebro desciende bruscamente, en menos

tiempo del que las neuronas necesitan para readaptarse. En este intervalo de tiempo (solo unas horas desde el cese del consumo) empieza a faltar la acción celular del alcohol, y esta falta de adaptación de las neuronas se manifiesta con la aparición de síntomas de abstinencia (Colombo, 1997), que en animales de laboratorio se caracteriza principalmente por un aumento del comportamiento de tipo ansiogénico, tanto tras la administración aguda de alcohol como tras administraciones repetidas, desde solo unas horas tras el cese del consumo (Zhang *et al.*, 2007) y hasta cuatro meses después de la última ingesta (Santucci *et al.*, 2008). En el caso de los pacientes humanos, la abstinencia a alcohol ha sido dividida en tres fases: en la primera fase (durante las primeras 24 horas tras el cese del consumo) aumenta principalmente la actividad simpática, provocando taquicardia, sudores, temblores, hipertensión, ansiedad y agitación. En la segunda fase (entre 24 y 48 horas después de la última ingesta de alcohol) se pueden presentar ataques epilépticos. Por último, en la tercera fase (entre 3 y 7 días tras el comienzo de la abstinencia) puede aparecer el *delirium tremens*, caracterizado por alucinaciones auditivas y visuales, confusión y desorientación, pérdidas de consciencia y una pronunciada hiperactividad autónoma. Incluso puede llegar a producirse la muerte por colapso respiratorio y cardiovascular. De este modo, la ausencia de alcohol actúa como un refuerzo negativo, y tanto los animales de laboratorio como los seres humanos tenderán a evitar el ambiente y los comportamientos que inducen este estado negativo. En estas condiciones la ingesta de etanol es capaz de suprimir e incluso prevenir la aparición de las molestias físicas y anímicas características de este proceso de desintoxicación (De Witte *et al.*, 2003). Sin embargo, se cree que el componente afectivo de la abstinencia (y no solo los síntomas físicos de la misma) es crítico para el desarrollo del alcoholismo. En esta circunstancia aparece un estado de ansiedad y depresión que es capaz, por sí solo, de inducir la recaída en muchos alcohólicos (Valdez y Koob, 2004).

Como ya se ha expuesto, la abstinencia al alcohol deja al descubierto todas las adaptaciones que el cerebro ha puesto en marcha para contrarrestar los efectos de la presencia continuada de alcohol. Entre las que más alcance tienen, y que por tanto son más evidentes, se encuentran las adaptaciones que se han producido en los sistemas que controlan el balance excitatorio e inhibitorio del cerebro, es decir, las modificaciones en los sistemas glutamatérgico y GABAérgico. El cese del consumo de alcohol conduce al cerebro a un estado de sobreexcitación, que es debido al aumento de la transmisión glutamatérgica, así como a una transmisión GABAérgica alterada. El incremento en la transmisión excitatoria responde no solo a una mayor liberación del propio glutamato, que ocurre de hecho en áreas como el estriado (Rossetti y Carboni, 1995; Rossetti *et al.*, 1999) el núcleo accumbens (Dahchour y De

Witte, 2000), la amígdala (Roberto *et al.*, 2004), y el hipocampo (Dahchour y De Witte, 2003), sino también al mayor número de receptores NMDA, a los cambios en la composición de sus subunidades y al incremento de los flujos de calcio a través de canales de calcio acoplados a receptores o dependientes de voltaje (De Witte *et al.*, 2003). El aumento de la transmisión excitatoria produce en el sistema nervioso procesos de excitotoxicidad; por este motivo, se considera que los cambios en el sistema glutamatérgico son uno de los responsables fundamentales de las alteraciones neuropatológicas inducidas por el consumo crónico de etanol en el cerebro de animales de laboratorio y de humanos (Fadda y Rossetti, 1998; De Witte *et al.*, 2003). Además, se ha visto que la administración de alcohol durante la retirada del alcohol reduce el daño neuronal inducido por la abstinencia, lo que sugiere que es la abstinencia la responsable de la posterior muerte neuronal (Nagy *et al.*, 2001; Nagy y László 2002).

Paralelamente se produce un descenso en la transmisión GABAérgica, en este caso más bien debido a una modificación en la composición de sus subunidades, que conlleva una alteración en la permeabilidad del canal y por tanto de la conductancia de los iones. De nuevo hay que señalar que se ha descrito un efecto diferente sobre la transmisión GABAérgica y dopaminérgica dependiendo del tipo de exposición(es) y abstinencia(s) al alcohol: un patrón intermitente de administración de etanol podría causar un aumento en las propiedades reforzantes del alcohol, como sugiere el hecho de que el etanol tenga un mayor efecto sobre las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral tras su administración intermitente (Diana *et al.*, 2003), es decir, un patrón de administración no continuo (una o dos administraciones diarias) podría resultar en cambios adaptativos completamente distintos sobre el sistema de recompensa de los que provocaría otro tipo de diseño experimental en el que la administración fuera más continuada (Diana *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que la exposición intermitente al alcohol (que por otra parte es la más habitual en humanos) aumenta la duración y la severidad de los signos presentes durante el síndrome de abstinencia (Becker *et al.*, 1997) y tiene efectos más severos sobre el SNC, dándose procesos de neurotoxicidad, electroencefalogramas alterados, mayor susceptibilidad a las convulsiones y un aumento en el estado de ansiedad del animal (Cagetti *et al.*, 2003; Kokka *et al.*, 2003; Qiang *et al.*, 2007). Es decir, un patrón intermitente de administración de alcohol provoca más daño celular y pérdida neuronal que un patrón continuo.

Como ya se ha explicado, la administración aguda de alcohol estimula la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas y la consiguiente liberación de dopamina de sus terminaciones sinápticas. Por el contrario, durante la crisis de abstinencia al

alcohol se observa una reducción de la actividad eléctrica de las neuronas dopaminérgicas y una disminución de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Koob, 2003). Se ha propuesto que este fenómeno podría ser la base de la disforia y la depresión asociadas a la crisis de abstinencia al alcohol (Colombo, 1997). La depleción dopaminérgica y la depresión del sistema de recompensa parecen constituir un denominador común de la abstinencia tras la intoxicación crónica con múltiples drogas (cocaína, anfetamina, opioides...). Estos cambios neuroadaptativos en la función dopaminérgica que se producen durante la abstinencia al alcohol han sido propuestos como parte del sustrato neurobiológico que provocaría el deseo de volver a consumir en sujetos dependientes. Sin embargo, la depleción dopaminérgica durante la abstinencia no parece ser una condición suficiente para la búsqueda de la droga que se produce en los estados dependientes (Fadda y Rossetti, 1998). El etanol, administrado de forma aguda, es capaz de estimular la liberación no solo de dopamina, sino también de serotonina en el núcleo accumbens. Por el contrario, la abstinencia provoca una deficiencia en la liberación de estos neurotransmisores. Una disminución en la neurotransmisión serotoninérgica ha sido asociada con ansiedad y depresión; y parece estar también involucrada en la dependencia al alcohol, así como en el mantenimiento de su consumo excesivo. Experimentos realizados con ratas dependientes al alcohol han sugerido que el déficit en la liberación de serotonina en el núcleo accumbens podría contribuir a las consecuencias afectivas negativas de la abstinencia al alcohol, y motivar el comportamiento de búsqueda de alcohol. En humanos se ha encontrado una menor disponibilidad de los transportadores de serotonina en el área de los núcleos del rafe, lo que ha sido correlacionado con un aumento de los niveles de ansiedad y depresión durante el periodo temprano de la abstinencia. La deficiencia de la actividad serotoninérgica en los alcohólicos podría resultar en un menor control de los impulsos sobre el consumo de drogas, particularmente sobre el consumo de alcohol (De Witte *et al.*, 2003).

Como ya se ha explicado, un aspecto importante del síndrome de abstinencia es la existencia de una mayor excitación central, que se corresponde con una sobreactividad del sistema nervioso simpático. Los niveles de noradrenalina se encuentran aumentados, por una parte, por la sobreestimulación de las neuronas noradrenérgicas debido al incremento de la transmisión glutamatérgica y, por otra parte, por la pérdida de autoinhibición de la propia noradrenalina, debido a un déficit en la función del autorreceptor α_2 (De Witte *et al.*, 2003).

El síndrome de abstinencia es también una fuente de estrés importante; el sistema límbico responde inmediatamente con un aumento de CRF que lleva además asociado la aparición de respuestas de tipo ansiogénico. Durante la abstinencia aguda al alcohol se

presenta igualmente un incremento en los niveles de cortisol; la magnitud de este aumento ha sido relacionada con la severidad de los síntomas del síndrome de abstinencia (Lê y Shaham, 2002). Sin embargo, el CRF es un neuropéptido que actúa no solo sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), sino que ejerce sus acciones también a otros niveles en el SNC. Así, durante la abstinencia a alcohol se produce un incremento en los niveles extracelulares de CRF, especialmente en el núcleo central de la amígdala (Merlo Pich *et al.*, 1995). La administración de antagonistas de CRF en este núcleo atenuan el aumento en las respuestas de tipo ansiogénico y el consumo exacerbado de alcohol asociado a la abstinencia alcohólica (Rassnick *et al.*, 1993c; Funk *et al.*, 2006).

También el NPY se encuentra involucrado en los mecanismos neurobiológicos del control de estrés. La abstinencia aguda del alcohol está asociada con un descenso en los niveles de NPY en ciertos núcleos de la amígdala y en la corteza piriforme; se ha propuesto que los cambios inducidos por el alcohol en la actividad del NPY en la amígdala podrían estar implicados no solo en las respuestas del estrés, sino también en los efectos motivacionales del etanol. De esta forma, la actividad reducida del NPY, junto con el incremento en la actividad del CRF, podrían constituir una de las bases motivacionales que influyen en la conducta de autoadministración de alcohol durante la abstinencia a esta sustancia (Koob, 2003; Valdez y Koob, 2004).

1.2.3.5. Recaída

El deseo o la necesidad de obtención de una droga que puede “inundar” a un adicto tras meses o incluso años después del último consumo de la droga es uno de los efectos más duraderos y que tienen más peso en los procesos adictivos (Kalivas y McFarland, 2003). En los estudios preclínicos en animales de laboratorio para evaluar la recaída al alcohol se emplean dos tipos de modelos experimentales: el modelo de privación de alcohol y el modelo de reestablecimiento o restitución (*reinstatement*). El primer modelo se basa en el estudio del comportamiento de ingesta de alcohol tras periodos prolongados de tiempo de abstinencia forzada en animales ya “expertos” en la ingesta alcohol. Se produce, tras la re-exposición al etanol, un aumento transitorio de la cantidad de alcohol que el animal bebe, con respecto a lo que bebía previamente a la privación; este fenómeno recibe el nombre de *alcohol deprivation effect* o ADE (Sinclair y Senter, 1967) y ha sido descrito en numerosas estirpes de ratas genéticamente seleccionadas, en ratones, primates, así como en humanos bebedores sociales. El ADE se presenta, en animales de laboratorio, en los paradigmas de libre elección (agua *vs.* alcohol) y de autoadministración operante. Los experimentos llevados a cabo bajo este último paradigma sugieren que el ADE podría ser debido a un aumento en las

propiedades reforzantes del alcohol, que se produciría tras su abstinencia prolongada. Por otra parte, el consumo aumentado de la droga no solo se presenta en el caso del alcohol, sino también con otras drogas de abuso, y además tampoco aparece de forma exclusiva en el caso de las sustancias de abuso, sino que se da también con otros tipos de refuerzo tales como el consumo de soluciones azucaradas, o la actividad sexual. Los modelos experimentales que estudian el fenómeno del ADE son útiles como modelo de recaída al alcohol, puesto que en la clínica también se presenta el aumento de la cantidad de alcohol que se consume tras la abstinencia. Sin embargo, muestran carencias con respecto a su validez etiológica, es decir, en este modelo se estudia el efecto de la re-exposición en sí misma, mientras que en el caso de los humanos lo que resulta también interesante es la motivación que conduce a la búsqueda compulsiva de la droga y a la recaída, es decir, el paso anterior a la recaída: la motivación que precede al consumo (Lê y Shaham, 2002).

Por su parte, en el modelo de restitución se evalúa la capacidad que presenta la exposición aguda a la droga, o de algún otro estímulo, para restituir el comportamiento de búsqueda de la droga, igualmente tras periodos prolongados de abstinencia (Lê y Shaham, 2002). Tanto en adictos humanos como en los modelos animales de recaída, esta vuelta al consumo de la droga se puede precipitar por tres tipos distintos de estímulos: (i) la exposición a un estímulo ambiental (es decir, a algo muy concreto en el contexto) que está fuertemente asociado con el consumo de la sustancia, (ii) el contacto con un estímulo farmacológico (que puede ser la droga misma o un agente farmacológico relacionado), o (iii) la exposición a ciertos elementos estresantes. Estos tres tipos de estímulos activan distintos mecanismos neurales, especialmente los circuitos implicados en la percepción sensorial. De esta forma, un adicto, en este caso un alcohólico, es capaz de distinguir claramente entre los tres tipos de incentivo, como podrían ser, por ejemplo, una botella de vino, los efectos de beber una copa, o una situación estresante que precipita el deseo y puede provocar la recaída a la bebida. Uno de los componentes de estas distintas percepciones es el valor subjetivo que el alcohólico (aunque esto es extensible a todas las adicciones) da a cada experiencia, es decir, mientras que la droga en sí misma constituye un refuerzo positivo, el ambiente estresante es interpretado como una circunstancia negativa. Aunque los tres tipos de eventos sensoriales son vividos de forma diferente por el adicto, todos ellos son capaces de provocar un estado interoceptivo relacionado que aumenta la probabilidad de volver a consumir la sustancia. Dada la respuesta comportamental común que tienen los adictos, se ha hipotetizado que, mientras que los circuitos neurales que median la percepción y la interpretación consciente de los estímulos son distintos, los circuitos que median el impulso y la re-iniciación del comportamiento de

búsqueda y el consumo de la sustancia son los mismos en todos los casos (Kalivas y McFarland, 2003).

Los tratamientos con antagonistas opioides para los receptores de tipo μ (naltrexona y naloxona) atenúan tanto el ADE como la restitución del comportamiento tóxico-dependiente inducido por la re-exposición al alcohol o a estímulos asociados al consumo (pero no por el estrés), lo que sugiere una participación de este tipo de receptores opioides, probablemente aquellos situados en las áreas implicadas en el refuerzo, en la recaída no solo del alcohol sino también a otras drogas de abuso (Lê y Shaham, 2002). Asimismo los antagonistas de los receptores de serotonina 5-HT₃ como el ondansetrón (medicamento utilizado en clínica para el tratamiento del alcoholismo) inducen no solo una disminución de la ingesta de alcohol durante la fase de consumo, sino también un descenso en el ADE y una menor tasa de recaída (Johnson *et al.*, 2000). Sin embargo, los estudios con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSIRs) como la fluoxetina han arrojado resultados controvertidos en cuanto a su capacidad para evitar la recaída al alcohol que hacen difícil elucidar el papel del sistema serotoninérgico en la recaída al alcohol (Johnson y Ait-Daoud, 2000). Otro de los medicamentos que ha sido empleado de forma habitual en el tratamiento del alcoholismo es el acamprosato, un análogo estructural sintético del GABA, que produce un descenso del consumo, de la aparición de síntomas de abstinencia, del ADE y de la recaída, presumiblemente por modificaciones en la transmisión glutamatérgica (Spanagel y Zieglgänsberger, 1997). Por último, los estudios realizados para comprender los mecanismos que subyacen a la recaída inducida por el estrés han mostrado la participación del CRF que, en el momento de la recaída actuaría sobre lugares distintos al eje HHA, de forma que algunos de éstos serían los que se encontrarían implicados en la recaída a las sustancias de abuso (Lê y Shaham, 2002). Se ha descrito que la abstinencia sostenida al alcohol aumenta la sensibilidad neuronal al CRF en ratas hasta 15 semanas después del cese del consumo, lo que podría inducir un incremento en la sensibilidad a los estímulos estresantes del ambiente y podría estar relacionado con la vulnerabilidad crónica a la recaída a largo plazo que se presenta en esta adicción (De Witte *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que en la acción del CRF sobre la recaída podrían estar implicados péptidos opioides endógenos, ya que la administración de nociceptina es capaz de bloquear la restitución del comportamiento de búsqueda de alcohol inducida por estrés (Martin-Fardon *et al.*, 2000).

Con respecto a los mecanismos cerebrales que subyacen a la recaída al alcohol, se ha propuesto que la activación del sistema dopaminérgico a nivel del sistema límbico y una alteración de la neurotransmisión glutamatérgica dentro de este sistema podrían jugar un papel

importante. Se cree, sin embargo, que los circuitos neurales que participan en la restitución del comportamiento de consumo son distintos en el caso de la que es inducida por estrés y de la que es inducida por un nuevo contacto con la droga (Lê y Shaham, 2002). También es importante señalar que la capacidad de un fármaco para disminuir la autoadministración de alcohol no tiene por qué verse acompañada de efectos positivos sobre la recaída, lo que hace aun más difícil la búsqueda de un tratamiento efectivo en las toxicomanías, y es una más de las evidencias de la complejidad, en todos los sentidos, de este tipo de desórdenes.

1.2.3.6. El alcoholismo como proceso neurodegenerativo

El consumo excesivo de alcohol, tanto agudo como crónico, así como su interrupción brusca, producen diversos síndromes neurológicos en humanos. La intoxicación alcohólica aguda y el síndrome de abstinencia son considerados en sí mismos síndromes neurológicos; además existen otros síndromes que responden más bien al consumo crónico de alcohol asociado o no con trastornos nutricionales. Entre ellos destacan el síndrome de Wernicke-Korsakoff, la polineuropatía alcohólica, la degeneración cerebelosa alcohólica, el síndrome de Marchiafava-Bignani y la mielinosi pontina central (Parés y Caballería, 2002). Sin embargo, aunque los alcohólicos humanos muestran neurodegeneración tras periodos muy prolongados de consumo excesivo de alcohol, en los modelos animales se pueden observar deterioros tras solo algunos días de exposición al etanol debido a procesos necróticos (Obernier *et al.*, 2002a), aunque en general se ha descrito que los daños son más pronunciados bajo protocolos de administración intermitente de etanol, es decir, que conllevan sucesivos periodos de abstinencia (Becker *et al.*, 1997; Cagetti *et al.*, 2003; Kokka *et al.*, 2003; Qiang *et al.*, 2007).

Aunque no están bien delimitados los efectos nocivos directos del alcohol y sus metabolitos *per se* y los que son más bien consecuencia de la presencia crónica de alcohol en el cerebro (cambios en la densidad de receptores, en la composición de subunidades, etc.), sí parece haber consenso en cuanto a que son las áreas corticolímbicas (bulbo olfatorio, corteza piriforme y entorrinal) y el hipocampo las más afectadas del cerebro (Collins *et al.*, 1996; Obernier *et al.*, 2002b; Mitirattanakul *et al.*, 2007).

En cuanto a los mecanismos moleculares que subyacen al efecto neurotóxico del alcohol, ya se ha mencionado previamente que tras la administración crónica de alcohol se produce un aumento compensatorio en el número de receptores NMDA o de otros sitios de unión relacionados con distintos tipos de canales de calcio, y/o alteraciones en la expresión de distintas subunidades de estos canales iónicos (que dan lugar a receptores más sensibles), lo que provoca un aumento de la sensibilidad neuronal al daño excitotóxico. Estas neuroadaptaciones se producen como respuesta a la inhibición permanente de los receptores

NMDA por parte de la molécula de etanol. Cuando el alcohol es retirado, este efecto inhibitor del etanol desaparece, por lo que, como consecuencia de los distintos cambios adaptativos desarrollados por la célula, los niveles de calcio intracelular aumentan en exceso, desestabilizándose así la homeostasis del calcio intracelular. Estos procesos podrían ser relevantes para la excitabilidad aumentada del SNC, que tiene como consecuencia la aparición de signos del síndrome de abstinencia como pueden ser los ataques (*seizures*) o los estados proconvulsivos, y podrían iniciar procesos de excitotoxicidad y pérdida de neuronas en ciertas áreas del cerebro durante los periodos de abstinencia (Nagy *et al.*, 2001). De hecho, uno de los tratamientos que se ha intentado emplear para prevenir los ataques inducidos por la abstinencia alcohólica es el antagonista NMDA dizocilpina (MK-801), observándose que, efectivamente, es capaz de prevenir estos ataques (Grant *et al.*, 1992); sin embargo, el tratamiento con MK-801 no mejoró el daño neuronal provocado por el etanol (Collins *et al.*, 1998; Corso *et al.*, 1998), posiblemente debido al efecto neurotóxico de este fármaco *per se* (Thomas *et al.*, 2002). Más recientemente se ha sugerido que la memantina (antagonista NMDA de baja afinidad y dependiente de la actividad del receptor) podría ser capaz de proteger del daño excitotóxico sin bloquear la neurotransmisión glutamatérgica basal necesaria para el funcionamiento normal del cerebro (Lipton y Chen, 2004).

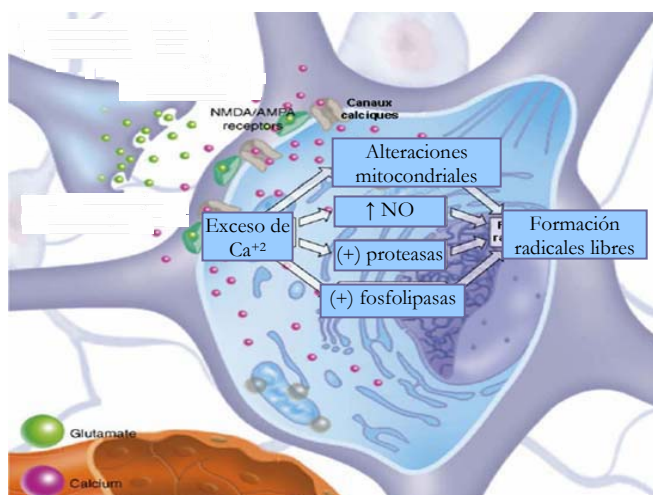


Figura 4. Procesos que intervienen en la muerte por excitotoxicidad. El aumento de la concentración intracelular de calcio induce la activación de múltiples procesos deletéreos que provocan, en último término, la muerte neuronal (A partir de Green y Shuaib, 2006)

De forma complementaria, también se ha hipotetizado que el etanol podría dañar al cerebro debido a un aumento en el estrés oxidativo. Así, el consumo crónico de alcohol lleva asociado, por un lado, daño oxidativo a proteínas celulares, lípidos y DNA, y por otro, un descenso de los niveles de los antioxidantes endógenos glutatión y superóxido dismutasa (Bailey *et al.*, 2001; Thirunavukkarasu *et al.*, 2003). El papel del estrés oxidativo en el daño cerebral inducido por el alcohol también ha sido estudiado tras la administración aguda de alcohol, donde se ha observado que en ratones se produce una pérdida de DNA mitocondrial

que puede ser prevenida tanto por la administración de antioxidantes como a través de la inhibición del metabolismo del etanol, lo que indicaría que el incremento en la producción de radicales superóxido sería principalmente debido a la disfunción mitocondrial provocada por el alcohol (Mansouri *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que la coadministración de antioxidantes (entre ellos el cannabinoide no psicoactivo cannabidiol) durante la exposición crónica o subcrónica al alcohol es capaz de proteger de la neurodegeneración cortical e hipocampal subsecuente (Herrera *et al.*, 2003; Hamelink *et al.*, 2005).

Por último, otro de los mecanismos sugeridos para explicar la neurodegeneración que aparece tras sufrir ciclos repetidos de consumo de alcohol y posteriores abstinencias es el edema cerebral, que está posiblemente asociado a una secreción en exceso de vasopresina (Lambie, 1985) y a alteraciones en el control celular del transporte iónico (Collins *et al.*, 1998). Este fenómeno conllevaría también neurotoxicidad y pérdida neuronal (Collins *et al.*, 1998).

2. SISTEMA CANNABINOIDE ENDÓGENO

2.1. Introducción

Los compuestos cannabinoides son algo más que los constituyentes psicoactivos de una droga de abuso. El término “cannabinoide” abarca todos aquellos compuestos que son activos sobre el sistema endógeno de señalización de tipo cannabinoide, e incluye no solo a los compuestos derivados de la planta *Cannabis sativa* (“fitocannabinoides”), sino también a los compuestos endógenos que forman parte de este sistema de neuromodulación (Ramos y Fernández-Ruiz, 2003). Actualmente se conocen muchos de los elementos que forman parte del sistema endocannabinoide y se han diseñado herramientas farmacológicas (ligandos sintéticos y otros compuestos capaces de actuar sobre diversos puntos de su metabolismo y mecanismos de acción) que han permitido en los últimos años avances fundamentales en el conocimiento de este sistema, y que, por tanto, han abierto las puertas a múltiples potenciales acciones terapéuticas, dejando hasta cierto punto a un lado el clásico tópico de los cannabinoides solo como una droga de abuso.



Las preparaciones de la planta de *Cannabis sativa*, como el hachís y la marihuana, han sido utilizadas con fines medicinales y/o recreativos desde la antigüedad. Su aplicación con fines medicinales comenzó hace más de 2000 años y se extendió a lo largo de la Edad Media hasta el comienzo del siglo XX, y en el Reino Unido su uso medicinal se mantuvo hasta la década de los 70. En la actualidad el cannabis es una de las drogas ilegales más ampliamente consumidas en el mundo occidental.

La *C. sativa* contiene aproximadamente 400 compuestos químicos diferentes, de los cuales unos 60 forman parte de la familia de los cannabinoides (fitocannabinoides). Los fitocannabinoides son sustancias procedentes del metabolismo secundario de la planta que se presentan de forma exclusiva en algunas variedades de la misma (Dewey, 1986). Entre estos fitocannabinoides los más ampliamente conocidos son el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) y el (-)-cannabidiol (CBD).

El descubrimiento de la molécula de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), el principal constituyente psicoactivo de la marihuana, por el grupo del profesor Mechoulam en los años 60 (Gaoni y Mechoulam, 1964) marcó el inicio del estudio de los compuestos cannabinoides, puesto que condujo a la identificación de otros ligandos cannabinoides, que a su vez permitieron la identificación, a finales de los años 80, de un receptor para cannabinoides al que posteriormente se denominó CB₁ (Devane *et al.*, 1988; Matsuda *et al.*, 1990). Este descubrimiento marcó un hito en la historia de los cannabinoides, ya que abrió las puertas a la existencia de un posible sistema de señalización endógeno, el sistema endocannabinoide. Posteriormente, se clonó otro receptor para cannabinoides, el receptor CB₂ (Munro *et al.*, 1993). La existencia de este sistema se confirmó con el descubrimiento de los primeros cannabinoides endógenos: la etanolamida del ácido araquidónico (N-araquidonil-etanolamina, AEA), que recibió el nombre de anandamida (de “ananda”, que significa “paz interior” en sánscrito) (Devane *et al.*, 1992), y el 2-araquidonil-glicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995), aunque después han sido descritas otras moléculas endocannabinoides. Paralelamente al descubrimiento de los receptores y de los cannabinoides endógenos, se desarrollaron antagonistas específicos para los receptores descritos: SR141716A o Rimonabant (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994), y SR144528 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998), antagonistas específicos de los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente, lo que permitió disponer de una herramienta

fundamental para la identificación del tipo de receptor implicado en cada uno de los efectos de los cannabinoides y también para el tratamiento de aquellas enfermedades en las que el sistema cannabinoide se ve afectado.

Los endocannabinoides, junto con los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y la maquinaria bioquímica para su síntesis y degradación, conforman el sistema endocannabinoide. A pesar de haber establecido los cimientos de este sistema cannabinoide endógeno, las investigaciones prosiguen y los descubrimientos que se realizan en relación a nuevos ligandos endógenos, precursores de rutas de síntesis alternativas, mecanismos de regulación de las enzimas implicadas en su síntesis y degradación, etc., son constantes. Actualmente siguen siendo numerosas las incógnitas que rodean a ciertos elementos del sistema endocannabinoide; sin embargo, hay un punto que no admite discusión, y es la importancia de un correcto funcionamiento de este sistema para el mantenimiento de la homeostasis, ya que se han observado cambios en el sistema endocannabinoide en numerosísimas situaciones patológicas. Por este motivo, la manipulación farmacológica de este sistema se ha planteado también como una herramienta terapéutica muy prometedora en el tratamiento de diversas patologías.

2.2.Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G. El primer receptor caracterizado por métodos radiométricos fue el receptor CB₁ (Devane *et al.*, 1988), cuya estructura molecular fue identificada poco tiempo después en la rata (Matsuda *et al.*, 1990) y en el ser humano (Gerard *et al.*, 1991). Las proteínas CB₁ contienen una secuencia altamente conservada entre las distintas especies de vertebrados (tanto mamíferos como no mamíferos) estudiadas (Valenti *et al.*, 2005).

En el cerebro de mamíferos, los receptores CB₁ se expresan preferentemente en poblaciones neuronales, donde participan en la inhibición de la liberación de ciertos neurotransmisores. Su distribución es muy amplia: estudios neuroanatómicos han revelado que su expresión es muy elevada en hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, ganglios basales, y de forma más moderada aparece en áreas límbicas como el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y la amígdala (Herkenham *et al.*, 1991) (figura 5). Los receptores CB₁ son uno de los receptores con acción neuromoduladora más abundantes del cerebro (Wilson y Nicoll, 2002). Astroцитos, oligodendrocitos y precursores neurales expresan también receptores CB₁ aunque en menor proporción (Rodríguez *et al.*, 2001; Molina-Holgado *et al.*, 2002; Aguado

et al., 2005). También se han encontrado receptores CB₁ en diversos tejidos periféricos (Galiegue *et al.*, 1995; Ishac *et al.*, 1996).

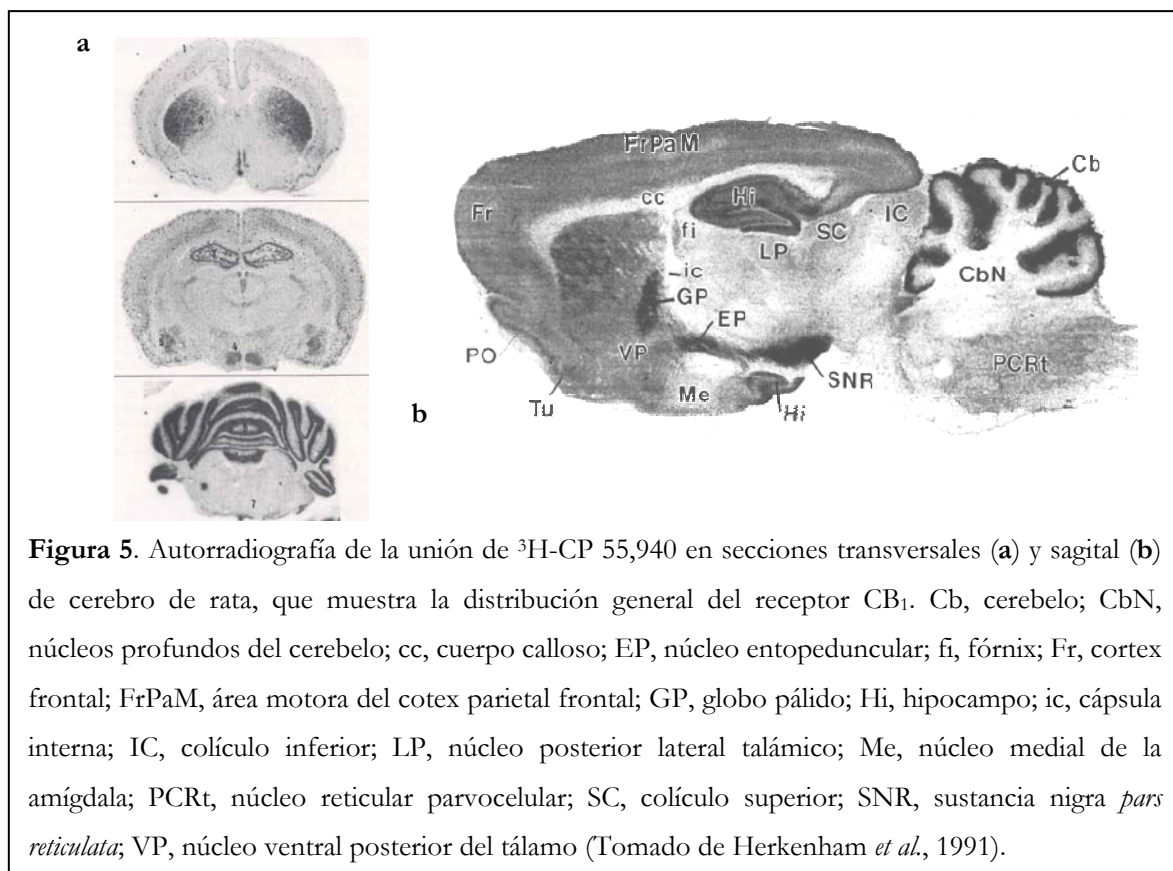


Figura 5. Autorradiografía de la unión de ³H-CP 55,940 en secciones transversales (a) y sagital (b) de cerebro de rata, que muestra la distribución general del receptor CB₁. Cb, cerebelo; CbN, núcleos profundos del cerebelo; cc, cuerpo calloso; EP, núcleo entopeduncular; fi, fórnix; Fr, corteza frontal; FrPaM, área motora del corteza parietal frontal; GP, globo pálido; Hi, hipocampo; ic, cápsula interna; IC, colículo inferior; LP, núcleo posterior lateral talámico; Me, núcleo medial de la amígdala; PCrt, núcleo reticular parvocelular; SC, colículo superior; SNR, sustancia nigra *pars reticulata*; VP, núcleo ventral posterior del tálamo (Tomado de Herkenham *et al.*, 1991).

Por su parte, los receptores CB₂ exhiben una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) con los receptores CB₁. También presenta mucha más divergencia en cuanto a su homología entre especies, siendo ésta solo del 81% entre la rata y el humano (Begg *et al.*, 2005). Estos receptores cannabinoides periféricos alcanzan densidades importantes en células hematopoyéticas y en distintos tipos de células inmunes, por lo que los efectos inmunomoduladores de los compuestos cannabinoides se atribuyen, fundamentalmente, a su interacción con este subtipo CB₂ (Mato *et al.*, 2003). De forma fisiológica, los receptores CB₂ están implicados en la regulación de diversas funciones inmunes como la liberación de citoquinas y la migración de células inmunes (Klein *et al.*, 2003). Además, se ha observado un aumento en la expresión de estos receptores en diversos tipos celulares del SNC en condiciones patológicas, ya sean agudas, como la isquemia (Ashton *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) o crónicas, como la enfermedad de Alzheimer (Benito *et al.*, 2003), el corea de Huntington (Sagredo *et al.*, 2007) o la esclerosis múltiple (Benito *et al.*, 2007) (para revisión ver Pazos *et al.*, 2005; Docagne *et al.*, 2008). Una característica importante de los

receptores CB₂ identificados en el SNC es que se encuentran preferentemente en células gliales (microglía reactiva o astrocitos) (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007).

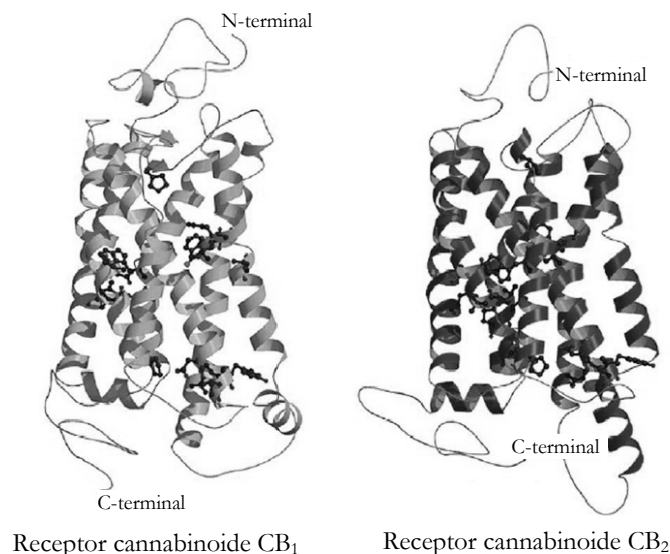


Figura 6. Representación tridimensional de la estructura de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ (Tomado de Choi *et al.*, 2005)

Recientemente se ha descrito además la existencia, en condiciones no patológicas, de receptores CB₂ en diversas estructuras cerebrales específicas. Por ejemplo, en tallo cerebral se ha identificado la presencia de receptores CB₂ funcionales, posiblemente implicados en el control de la emésis (Van Sickle *et al.*, 2005). También han sido descrita su presencia en hipocampo, cerebelo y otras estructuras cerebrales (Gong *et al.*, 2006), aunque los estudios inmunohistoquímicos realizados por estos autores han estado sujetos a una fuerte controversia por la falta de controles apropiados. Los datos presentados por estos autores (Gong *et al.*, 2006; Onaivi *et al.*, 2006a, 2006b) indican la presencia de receptores CB₂ en el SNC, y sugieren la co-localización de receptores CB₁ y CB₂ en las mismas estructuras cerebrales, aunque con un patrón diferente de distribución neuronal, donde probablemente actuarían de forma independiente y/o cooperativa. Las implicaciones fisiológicas de estos receptores CB₂ en cerebro no han sido aun suficientemente investigadas, aunque se ha sugerido su posible participación en estados depresivos y de adicción a drogas de abuso (Gong *et al.*, 2006; Onaivi *et al.*, 2006a, 2006b).

Por último, en estudios realizados con ratones *knock-out* para CB₁ (CB₁^{-/-}) o CB₂ (CB₂^{-/-}) se ha observado que algunos de los efectos de los endocannabinoides no están mediados ni por CB₁ ni por CB₂ (Howlett, 2004). Se ha sugerido que algunos de estos efectos podrían ser explicados por ciertas propiedades químicas de los ligandos cannabinoides y no

estarían mediados por receptores específicos. Este sería el caso, por ejemplo, de los efectos atribuidos a las propiedades antioxidantes de ciertos ligandos cannabinoides, o a sus propiedades lipofílicas, que podrían producir interacciones inespecíficas a nivel de la membrana plasmática o en diferentes sitios intracelulares (Begg *et al.*, 2005). Sin embargo, hay otras evidencias que no pueden ser explicadas por estos mecanismos, y que sugieren la existencia de otro(s) receptor(es) cannabinoide(s). Por ejemplo, el tejido cerebral de estos ratones CB₁^{-/-} presenta, a pesar de todo, unión (*binding*) en presencia del agonista sintético para CB₁ WIN55,212-2. Además, tanto el WIN55,212-2 como la anandamida, pero no el Δ⁹-THC, aumentan el *binding* de [³]GTPγS en los cerebros de estos ratones, y este *binding* puede ser bloqueado por el antagonista selectivo para CB₁ SR141716. Estos resultados sugieren la presencia de un tercer receptor cannabinoide, no clonado aún, que sería sensible a WIN55,212-2, anandamida y SR141716, pero no a Δ⁹-THC (Howlett, 2004). Además, experimentos realizados sobre el sistema cardiovascular han mostrado que la anandamida, capaz de inducir vasodilatación mesentérica que puede ser bloqueada por SR141716 en animales *wild-type*, mantiene esta propiedad en los animales CB₁^{-/-} (Wilson y Nicoll, 2002). Dos receptores huérfanos acoplados a proteínas G han sido propuestos recientemente como nuevos receptores cannabinoides: GPR55, de amplia expresión tisular, parece ser activado por múltiples ligandos cannabinoides y estar implicado en procesos del metabolismo lipídico y en la función vascular (Baker *et al.*, 2006; Brown, 2007); y GPR119, propuesto como receptor para oleoiletanolamida (Brown, 2007).

Tabla 1. Abundancia relativa de algunos componentes del sistema endocannabinoide en diversas regiones cerebrales.

Estructura cerebral	Anandamida	2-AG	Receptor CB ₁
Corteza cerebral	+	++	++
Hipocampo	+++	++++	++++
Estriado	+++	++++	++++
Núcleos límbicos	++	++++	++
Diencéfalo	+	+	+++
Tronco encefálico	++++	+++++	++
Mesencéfalo *	++	++	++
Cerebelo	+	++	+++++
Médula espinal	+++	++++	++

* Contiene la sustancia nigra

Anandamida (pmol/g tejido): + (<20); ++ (20-40); +++ (40-60); ++++ (60-80); +++++ (>80)

2-Araquidonilglicerol (nmol/g tejido): + (<3); ++ (3-6); +++ (6-9); ++++ (9-12); +++++ (>12)

Receptor CB₁ (fmol/mg tejido): + (<250); ++ (250-500); +++ (500-750); ++++ (750-1000); +++++ (>1000)

2.3. Ligandos cannabinoides y moléculas relacionadas

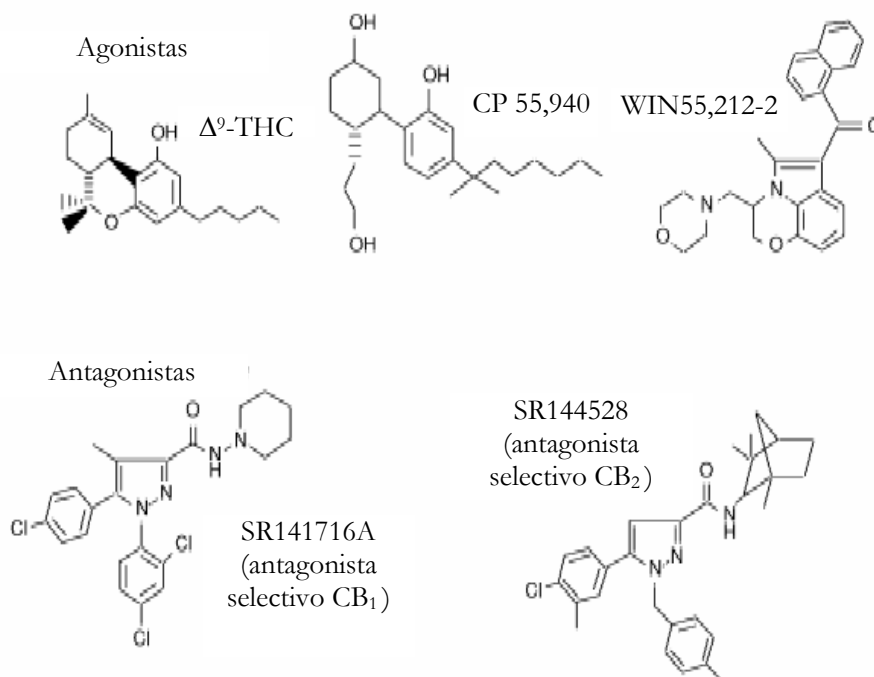
La naturaleza extremadamente hidrofóbica de los compuestos cannabinoides hace difícil su disolución en soluciones acuosas, y ha entorpecido en gran medida el estudio del sistema endocannabinoide. Sin embargo, con la mejor caracterización de las propiedades biofísicas de estos compuestos, se ha avanzado en la síntesis de nuevos ligandos útiles para el estudio de este sistema (Lupica y Riegel, 2005). Los ligandos endógenos, o endocannabinoides, han sido identificados en todos los *phila* estudiados, y todos suelen contener en su estructura química ácido araquidónico (Valenti *et al.*, 2005). A pesar de la baja homología que presentan los receptores CB₁ y CB₂, tanto su farmacología como su afinidad por la mayoría de los agonistas cannabinoides, endógenos y exógenos, es muy similar (Begg *et al.*, 2005).

Los agonistas cannabinoides se pueden clasificar en cuatro grupos de compuestos en función de su estructura química: cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides. El grupo de cannabinoides clásicos incluye compuestos con estructura de dibenzopirano, como son los cannabinoides derivados de la *C. sativa* (entre ellos, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinal y cannabidiol) y los análogos sintéticos del Δ^9 -THC, como el HU-210 o la nabilona. La afinidad de estos agonistas por los receptores CB₁ y CB₂ es variable, y el que presenta una mayor potencia es el HU-210. Pequeñas modificaciones químicas de la molécula de Δ^9 -THC han permitido el desarrollo de agonistas selectivos de los receptores CB₂ como el JWH-051 y el JWH-133, entre otros (Huffman, 2005).

Los cannabinoides no clásicos son análogos bicíclicos y tricíclicos que carecen del anillo pirano. El principal representante de este grupo es el CP55,940, cuya forma tritiada se utilizó para demostrar, por primera vez, la presencia de receptores específicos para cannabinoides en cerebro de rata (Howlett *et al.*, 1990). La afinidad del CP55,940 por los receptores cannabinoides es notablemente superior a la del Δ^9 -THC, aunque al igual que éste, tampoco exhibe selectividad por ninguno de los tipos CB₁ o CB₂ (Mato *et al.*, 2003).

El tercer grupo de compuestos cannabimiméticos, los aminoalquilindoles, incluye moléculas cuya estructura química deriva de la pravadolina, y difiere bastante de la de los dos grupos de compuestos anteriormente mencionados. De los pertenecientes a este grupo, el más empleado es el WIN55,212-2, que presenta una alta afinidad y eficacia en su interacción con ambos tipos de receptores cannabinoides, aunque exhibe cierta selectividad por los receptores CB₂. Su actividad farmacológica en ensayos *in vivo* es similar a la del Δ^9 -THC, aunque existen evidencias de que el WIN55,212-2 interacciona con los receptores cannabinoides de manera distinta a como lo hacen los análogos clásicos y no-clásicos (Mato *et al.*, 2003).

Figura 7. Estructura del Δ^9 -THC y otros agonistas y antagonistas cannabinoides comúnmente empleados en el laboratorio



El último grupo de moléculas con actividad cannabimimética, el de los eicosanoides, se ha desarrollado a partir del descubrimiento de la existencia de ligandos cannabinoides endógenos, que tienen precisamente este tipo de estructura. Los endocannabinoides derivan estructuralmente del ácido araquidónico (figura 8), y sus principales representantes son la *N*-araquidonoil-etanolamina o anandamida (Devane *et al.*, 1992) y el 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995), aunque en los últimos años se han descrito otros posibles ligandos endógenos: el 2-araquidonoil-gliceril éter (noladín éter) (Hanus *et al.*, 2001), la *O*-araquidonoil-etanolamina (virodamina) (Porter *et al.*, 2002) y la *N*-araquidonil-dopamina (NADA) (De Petrocellis *et al.*, 2004). Los endocannabinoides difieren en su selectividad por los receptores CB₁ y CB₂; así, anandamida, NADA y noladín éter son más selectivos para el receptor CB₁, mientras que la virodamina parece tener una mayor selectividad por CB₂. Por su parte el 2-AG es equipotente para los dos subtipos de receptores cannabinoides (De Petrocellis *et al.*, 2004). Algunos de los compuestos sintéticos con estructura eicosanoide son la metanandamida, la araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA) o la araquidonoilciclopropilamida (ACPA), todos ellos selectivos para CB₁ (Mato *et al.*, 2003).

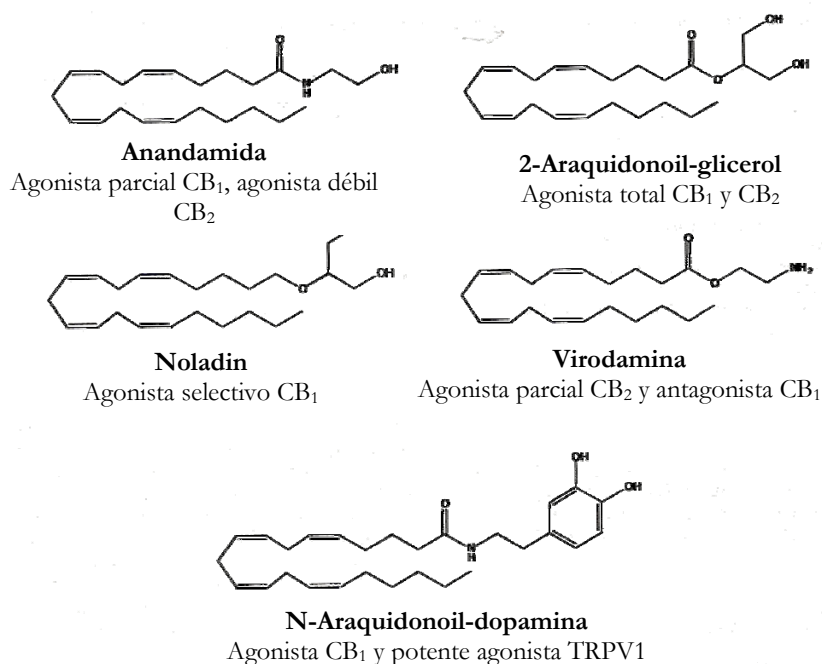


Figura 8: Estructura química de los endocannabinoides

Además de los ligandos endógenos mencionados, en los últimos años han cobrado importancia un conjunto de moléculas estructuralmente relacionadas con la anandamida, que pertenecen a la familia de las *N*-aciletanolaminas (NAEs). En particular, han sido aisladas y descritas la *N*-oleíletanolamina (OEA), la *N*-palmitoíletanolamina (PEA), la *N*-linoleíletanolamina (LEA) y la *N*-estearoíletanolamina (SEA). Estos compuestos presentan actividad farmacológica *in vivo* de tipo endocannabinoide; sin embargo, sus efectos no pueden adscribirse a la activación de ninguno de los receptores cannabinoides conocidos hasta el momento, ya que no se unen a ellos (Maccarrone *et al.*, 2002; Capasso *et al.*, 2001; Conti *et al.*, 2002; Farquhar-Smith *et al.*, 2002; Terrazzino *et al.*, 2004). En el caso de la OEA, sus efectos están mediados a través de la activación del receptor PPAR- α (*peroxisome-proliferator-activated receptor-alpha*) (Fu *et al.*, 2003). Algunas de las acciones conocidas de estas moléculas incluyen el control del dolor, la inflamación, el metabolismo lipídico y el control de la ingesta (tabla 2) (Calignano *et al.*, 1998; Lambert y Di Marzo, 1999; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; Terrazzino *et al.*, 2004; Guzman *et al.*, 2004; Lo Verme *et al.*, 2005). Al conjunto de estas moléculas se les ha denominado de forma genérica “moléculas *entourage*”, ya que se ha hipotetizado que estas moléculas, al ser también degradadas por la FAAH como la anandamida, ocupan a esta enzima, evitando la degradación de la anandamida y haciendo así más duraderos sus efectos (Lambert y Di Marzo, 1999; Fowler 2003).

Tabla 2. Principales acciones descritas para las NAEs

Molécula	Acción	Referencia
SEA	• Mismos efectos que la anandamida en catalepsia, motilidad, analgesia y temperatura corporal en ratones	• Maccarrone <i>et al.</i> , 2002
	• Efecto anorexigénico en ratones (opuesto a anandamida)	• Terrazzino <i>et al.</i> , 2004
OEA	• Papel protector cardíaco (rata)	• Su <i>et al.</i> , 2006
	• Inhibición de la ingesta (rata y ratón)	• Rodríguez de Fonseca <i>et al.</i> , 2001; Fu <i>et al.</i> , 2003; Nielsen <i>et al.</i> , 2004
	• Estimulación de la movilización y oxidación de ácidos grasos tanto en rata como en ratón	• Guzman <i>et al.</i> , 2004; Fu <i>et al.</i> , 2005
	• Propiedades analgésicas en dolor visceral e inflamatorio	• Suardiaz <i>et al.</i> , 2007
LEA	• Regulación de la ingesta de ácidos grasos en ratas	• Fu <i>et al.</i> , 2007
PEA	• Aumenta las propiedades antiproliferativas de la anandamida	• Di Marzo <i>et al.</i> , 2001
	• Aumento de la motilidad microglial inducida por anandamida	• Franklin <i>et al.</i> , 2003

Con respecto a los antagonistas de los receptores cannabinoides, el primero en ser caracterizado y el más ampliamente utilizado como antagonista de los receptores CB₁ es el diarilpirazol SR141716, denominado posteriormente “rimonabant” y en su forma de comercialización clínica “Acomplia[®]” (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Este compuesto exhibe una marcada selectividad por los receptores CB₁ frente a los CB₂, y es capaz de prevenir y/o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides que actúan a través de CB₁ tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Otros antagonistas de los receptores CB₁ son el AM-251, el AM-281 (Mato *et al.*, 2003) y el SR147778 (“surinabant”) (Rinaldi-Carmona *et al.*, 2004).

En relación con los antagonistas del receptor CB₂, la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo de este tipo de receptor es otro diarilpirazol, el SR144528 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998). Otros fármacos utilizados como antagonistas cannabinoides selectivos para los receptores CB₂ son el aminoalquilindol AM-630 y el cannabinoide clásico O-1184 (Mato *et al.*, 2003).

El descubrimiento de la maquinaria de síntesis y degradación de endocannabinoides ha abierto el camino al conocimiento de nuevas herramientas cannabinoides encaminadas a la potenciación del tono cannabinoide endógeno. Hasta el momento sólo disponemos de compuestos capaces de bloquear la ruta catabólica de la señal cannabinoide, o bien a nivel de la inhibición del transportador de anandamida, o bien inhibiendo su hidrólisis (tabla 3). Estos

fármacos resultan de gran interés farmacológico, no sólo desde el punto de vista de su aplicación en investigación, sino también por su potencial y prometedor uso terapéutico.

Tabla 3. Principales compuestos sintéticos que favorecen la actividad endocannabinoide

Inhibidores del transportador de membrana de anandamida	
AM404	Beltramo <i>et al.</i> , 1997
VDM11 y VDM13	De Petrocellis <i>et al.</i> , 2000, 2001
UCM-707	López-Rodríguez <i>et al.</i> , 2001
OMDM-1 y OMDM-2	Ortar <i>et al.</i> , 2003
Inhibidores de la hidrólisis de anandamida	
N-araquidonil-serotonina	Bisogno <i>et al.</i> , 1998
AM374	Deutsch <i>et al.</i> , 1997
URB-597 y URB-532	Kathuria <i>et al.</i> , 2003

2.4. Metabolismo de los cannabinoides

Los endocannabinoides son moléculas sinápticas peculiares, ya que en parte cumplen los requisitos de cualquier neurotransmisor, esto es, son sintetizados y liberados por neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membrana y finalmente son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el caso de los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides no son liberados por exocitosis desde el interior de vesículas sinápticas, sino producidos a demanda tras la llegada de diversos estímulos fisiológicos y patológicos (Di Marzo *et al.*, 1998). Datos farmacológicos y electrofisiológicos han mostrado que el flujo de calcio y/o la activación de ciertos receptores metabotrópicos, de forma independiente o coordinada, pueden inducir la formación de endocannabinoides (Wilson y Nicoll, 2002). Otra de las diferencias importantes entre los endocannabinoides y los neurotransmisores clásicos es su papel fisiológico como mensajeros retrógrados, que se detallará más adelante.

Con respecto a las síntesis de anandamida, ésta puede ser sintetizada a través de tres rutas distintas. La primera implica la condensación directa de ácido araquidónico y etanolamina; ambos pueden ser obtenidos a partir de la ruptura de precursores fosfolípidicos de membrana por acción de las fosfolipasas A₂ y D, respectivamente (Vinod y Hungund, 2005) (figura 9). La segunda ruta de síntesis de anandamida se produce gracias a la activación de la enzima N-acil-transferasa (NAT), que es activada por calcio y AMPc, y que facilita la transferencia de una molécula de ácido araquidónico desde un sn-1 araquidonil-fosfolípido a

una molécula de fosfatidiletanolamina, para formar N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina (NAPE). La molécula de NAPE es después cortada por una fosfolipasa, liberándose entonces la anandamida (Di Marzo *et al.*, 1994) (figura 9). Recientemente se ha descubierto una ruta alternativa para la síntesis de anandamida, activa tanto a nivel cerebral como en macrófagos, y que contempla la formación de anandamida fosforilada, y su posterior desfosforilación a través de diversas fosfatasas (Liu *et al.*, 2006).

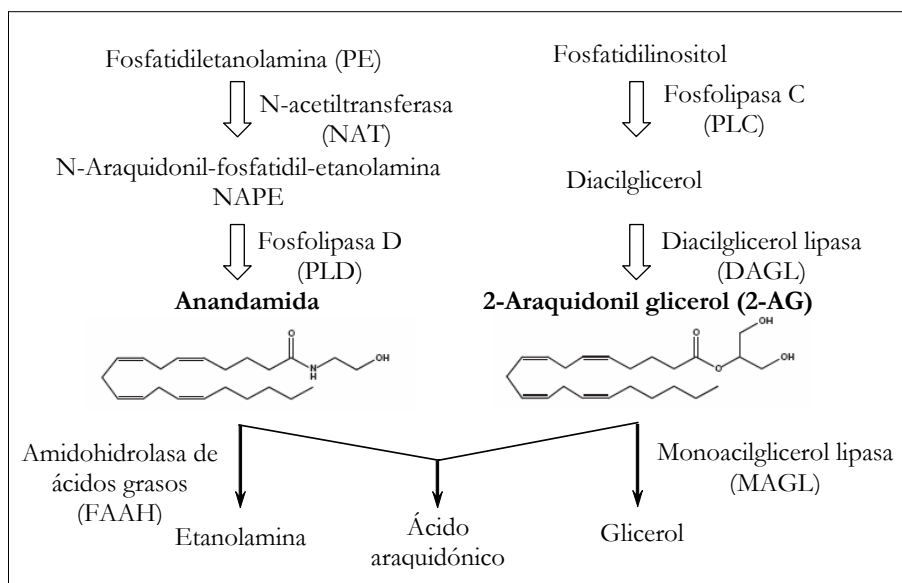


Figura 9. Esquema de las principales rutas de síntesis y degradación de dos de los endocannabinoides más conocidos, anandamida y 2-araquidonil glicerol (2-AG).

Por su parte, la síntesis de 2-AG también se puede producir por dos mecanismos distintos. Uno de ellos incluye la hidrólisis de fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa C (PLC) para producir diacilglicerol, que puede a su vez ser convertido en 2-AG por la acción de una diacilglicerol lipasa. De forma alternativa, la fosfolipasa A_1 puede generar un lisofosfolípido, que puede ser hidrolizado a 2-AG por una enzima liso-PLC (Vinod y Hungund, 2005). Sin embargo, la presencia de 2-AG en células y tejidos no va dirigida, de manera exclusiva, a la activación de receptores cannabinoides, ya que este compuesto se encuentra en el centro de diversas rutas metabólicas. El 2-AG es un importante precursor y/o producto de degradación de fosfo-, di- y tri-glicéridos, así como también del ácido araquidónico. Por este motivo los niveles de 2-AG en el cerebro son mucho mayores que los de anandamida (Sugiura *et al.*, 1995; Stella *et al.*, 1997).

Los datos acerca de la biosíntesis de los otros endocannabinoides (noladin eter, NADA y virodamina) no son aún concluyentes. En lo que respecta a la síntesis de noladin eter, ésta parece estar mediada por una ruta no dependiente de fosfolípidos o por una ruta

independiente de Ca^{2+} (De Petrocellis *et al.*, 2004). En el caso de NADA, datos preliminares sugieren que éste se produce, de manera exclusiva, tras la reacción entre dopamina y araquidonil-coenzima A (De Petrocellis *et al.*, 2004). Por último, aunque hasta el momento no se han publicado datos acerca de los posibles mecanismos de síntesis de la virodamina, que parece acompañar a la anandamida en todos los tejidos analizados (Porter *et al.*, 2002), se ha sugerido la posibilidad de una transformación no enzimática de *N*-acetiletanolamina en su correspondiente *O*-acil ester, y viceversa (Markey *et al.*, 2000).

Tras su síntesis, la anandamida y el 2-AG son inmediatamente liberados al espacio extracelular a través de mecanismos desconocidos por el momento, aunque se ha propuesto que el mismo transportador responsable de su recaptación sea el que se encargue también de su liberación (figura 11). Una vez en el espacio sináptico, los endocannabinoides actúan, principalmente y con diferente selectividad en cada caso, sobre los receptores CB_1 y CB_2 , especialmente (en el caso de los receptores CB_1) sobre aquellos situados de forma presináptica en los terminales neuronales (aunque también pueden actuar sobre los localizados sobre las neuronas postsinápticas, regulando su propia síntesis por inhibición de la adenilil ciclasa). Anandamida y NADA pueden unirse no solo a receptores cannabinoides, sino que también pueden actuar sobre sitios de unión de canales iónicos intracelulares, como los receptores vanilloides TRPV1 y canales de calcio tipo T (De Petrocellis *et al.*, 2004).

La finalización de la acción de los endocannabinoides sobre los receptores comienza con su recaptación por neuronas o células gliales, a través de un transportador de membrana que aún no ha sido clonado, al que se ha llamado *anandamide membrane transporter*, o AMT (Di Marzo *et al.*, 1994), gracias al cual se produce una rápida finalización de la señal endocanabinoide. Se cree que el mismo transportador media la recaptura celular de todos los endocannabinoides (Wilson y Nicoll, 2002), aunque los inhibidores del AMT no han sido aún probados para la virodamina, el noladín eter o NADA (De Petrocellis *et al.*, 2004).

Una vez en el interior de la célula, los endocannabinoides son degradados a través de una o más reacciones enzimáticas, produciéndose así su inactivación. La enzima FAAH (*fatty acid amide hydrolase*) es una serín-hidrolasa anclada a la membrana que se encuentra preferentemente localizada en las zonas somatodendríticas de las neuronas (Vinod y Hungund, 2005). Su acción sobre la anandamida y el 2-AG rinde ácido araquidónico y etanolamina o glicerol, respectivamente (De Petrocellis *et al.*, 2004). El 2-AG puede ser, además, degradado por una monoacilglicerol lipasa (MAGL), que de hecho se ha propuesto que sea la responsable de la degradación de la fracción de 2-AG que actúa en la transmisión endocanabinoide (De Petrocellis *et al.*, 2004). Por otra parte, la anandamida y el 2-AG pueden ser también

metabolizados por lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Vinod y Hungund, 2005) rindiendo, por ejemplo, compuestos intermedios de la ruta de las prostaglandinas y las prostamidas; estas reacciones de oxidación, siendo procesos que conducen a la inactivación parcial o completa de estos endocannabinoides, son también procesos que pueden producir compuestos activos sobre otras dianas moleculares que podrían representar, potencialmente, el enlace entre un tipo de señal y otra(s) (De Petrocellis *et al.*, 2004). Se ha propuesto que los sistemas enzimáticos de síntesis y degradación ejerzan una estrecha regulación temporal y espacial de la señalización endocannabinoide (Leung *et al.*, 2006; Marsicano y Lutz 2006; Pagotto *et al.*, 2006).

2.5. Mecanismos de acción molecular de los cannabinoides en el SNC

El papel fisiológico más ampliamente estudiado de los endocannabinoides es su actuación como mensajeros retrógrados, es decir, estos compuestos son liberados desde la neurona postsináptica tras la despolarización, activan los receptores CB₁ situados en los terminales axónicos de la neurona presináptica, inhibiendo la liberación del neurotransmisor (figura 10). Ésta acción de los endocannabinoides permite a las neuronas postsinápticas la autorregulación de la actividad sináptica que reciben, en función de su nivel de actividad (Alger, 2002; Wilson y Nicoll, 2002). Se cree que la señalización retrógrada de las moléculas endocannabinoides está ampliamente distribuida en todo el SNC, aunque parece que está más concentrada en ciertos fenotipos neuronales (neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas y colinérgicas) dentro de regiones cerebrales particulares (Hoffman *et al.*, 2003b; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005).

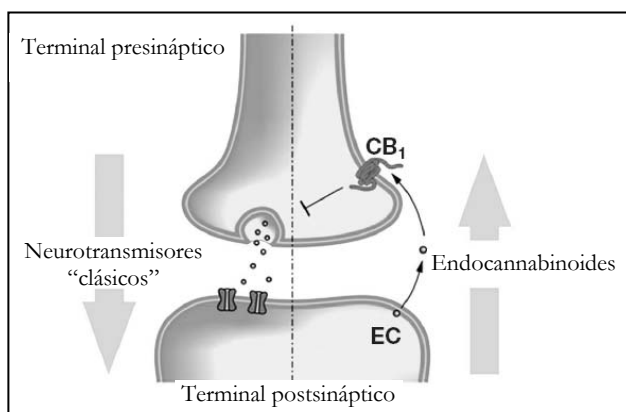


Figura 10.

Señalización cannabinoide. Los endocannabinoides (EC) pueden actuar como neurotransmisores retrógrados inhibiendo la liberación de neurotransmisores “clásicos” (tomada de Marsicano y Lutz, 2006).

La transducción de señales a través de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ ocurre fundamentalmente a través de su interacción con proteínas G del subtipo G_{i/o}, que conduce, entre otros efectos, a la inhibición del enzima adenilciclase (figura 11) (con el consiguiente

descenso en los niveles de AMPc y el bloqueo transitorio de los efectos a corto plazo mediados por proteína quinasas tipo A (PKA). Se produce, asimismo, la estimulación de las vías de varias quinasas intracelulares como las quinasas activadas por mitógeno o MAP quinasas (MAPK), ERK y otras (Pertwee, 1997; Galve-Roperh *et al.*, 2002). Además, los receptores cannabinoides CB₁ (pero no los CB₂) están acoplados, a través de proteínas G_{i/o}, a canales iónicos de distinto tipo, de modo que la activación de receptores CB₁ conduce a una regulación negativa de canales de calcio de tipo -N, -L y -P/Q, y positiva de corrientes rectificadoras de potasio (Pertwee, 1997; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005), lo que, en último término, lleva a la inhibición de la liberación de potasio. Por último, la activación de los receptores CB₁ (y no de CB₂) produce la estimulación de otras quinasas, como la fosfatidilinositol 3 quinasa y la proteína quinasa B (Guzmán *et al.*, 2002). Todos estos efectos están relacionados con el control de la excitabilidad neuronal y con la influencia inhibidora de los agonistas cannabinoides sobre la liberación de distintos neurotransmisores (Di Marzo *et al.*, 1998; Ohno-Shosaku *et al.*, 2002; De Petrocellis *et al.*, 2004).

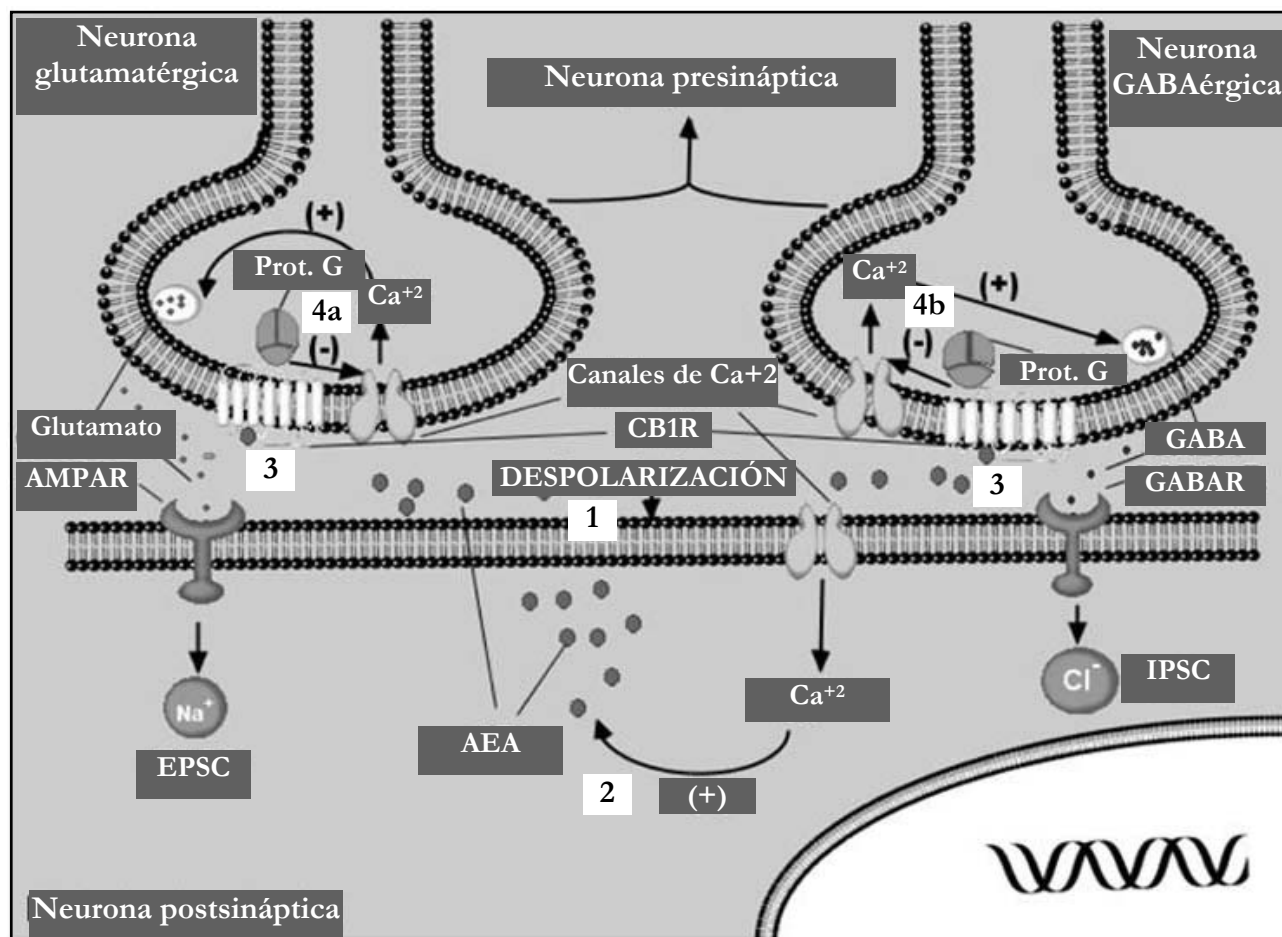


Figura 11. Modelo hipotético de la acción de los endocannabinoides sobre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria a través de su actividad como mensajeros retrogrades. La despolarización de la neurona postsináptica induce la síntesis (2) y liberación de endocannabinoides como la anandamida. Los endocannabinoides liberados activan entonces a los receptores CB₁ (CB1R) (3) en los terminales presinápticos e inhiben la liberación de glutamato (a la izquierda) (4a) o GABA (a la derecha) (4b), mediante la inhibición de canales de calcio. (Tomado de Basavarajappa, 2007)

Con respecto a las acciones que ejercen algunos endocannabinoides sobre los receptores vanilloides (TRPV1), se ha descrito que, aunque en condiciones fisiológicas la potencia de la anandamida para inducir los efectos mediados típicamente por receptores TRPV1 es entre 5 y 20 veces menor que su potencia sobre los receptores CB₁, en condiciones patológicas esta potencia podría verse incrementada hasta 10 veces (Di Marzo *et al.*, 2002), de modo que la lista de los efectos farmacológicos de los endocannabinoides mediados por TRPV1 es cada vez más amplia. Por este y otros motivos, se ha sugerido que los receptores TRPV1 y CB₁ podrían ser considerados como los receptores ionotrópicos y metabotrópicos, respectivamente, para la misma clase de amidas de ácidos grasos endógenas, que incluirían hasta el momento a la anandamida y a NADA (Di Marzo *et al.*, 2002). Este último

endocannabinoide es capaz de activar a los receptores TRPV1 en células aisladas con una potencia mayor que la de la anandamida y sólo ligeramente inferior que la capsaicina, el agonista exógeno más potente conocido para receptores vanilloides TRPV1 (Huang *et al.*, 2002).

Se ha propuesto también que, puesto que la estimulación de los receptores TRPV1 por la anandamida tiene lugar a través de la unión al lado citosólico del receptor, la anandamida, un vez sintetizada por células que expresaran TRPV1 (neuronas sensoriales y centrales, queratinocitos y células epiteliales) activaría estos receptores antes de su salida de la célula y de su acción sobre otras dianas situadas en la misma o en neuronas adyacentes. Por otra parte, también se ha descrito que, cuando la anandamida extracelular activa secuencialmente a receptores CB₁ y TRPV1 en la misma célula, se produce un aumento de las respuestas mediadas por este tipo de receptores vanilloides (De Petrocellis *et al.*, 2004).

2.6. Neuroprotección mediada por cannabinoides

Los agonistas cannabinoides han sido descritos como neuroprotectores en modelos animales de isquemia, excitotoxicidad y trauma cerebral (Mechoulam *et al.*, 2002; Van der Selt y Di Marzo, 2005) y también en enfermedades neurodegenerativas crónicas (para reciente revisión ver Sagredo *et al.*, 2007). Los mecanismos moleculares que están implicados en las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides son muy diversos y, frecuentemente, se complementan entre sí. Entre estos mecanismos cabe destacar:

- prevención de la muerte neuronal por excitotoxicidad, en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, gracias a su capacidad para modular la transmisión glutamatérgica excitatoria a través de receptores CB₁ presinápticos (Molina-Holgado *et al.*, 1997; Hampson *et al.*, 1998; Marsicano y Lutz, 1999; Skaper *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Nadler *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2005; Fernández-López *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2007).
- modulación de la respuesta inmune y de la liberación de mediadores proinflamatorios, a través de su acción sobre receptores CB₁, CB₂ e incluso a través de mecanismos no mediados por receptores CB₁ ni CB₂, (Stella, 2004; Klein, 2005; Correa *et al.*, 2005, 2007)
- activación de rutas de señalización de protección celular como las mediadas por quinasas B/Akt (Molina-Holgado *et al.*, 2002), PKA (Kim *et al.*, 2005) o factores neurotróficos (Khaspekov *et al.* 2004)

- modulación de la excitabilidad neuronal y la homeostasis del calcio a través de efectos sobre canales de calcio, de potasio y de sodio, receptores NMDA y AMPA, uniones gap y reservas intracelulares de calcio (Caulfield y Brown, 1992; Mackie y Hille, 1992; Mackie *et al.*, 1993; Nadler *et al.*, 1995; Venance *et al.*, 1995; Hampson *et al.*, 2000; Wilson y Nicoll, 2001; Docagne *et al.*, 2007)
- propiedades antioxidantes de algunos cannabinoides (Hampson *et al.*, 1998; Marsicano *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007)
- hipotermia mediada a través de receptores CB₁, lo que probablemente reduce la tasa metabólica y la demanda de oxígeno (Leker *et al.*, 2003).

2.7. Papel fisiológico del sistema endocannabinoide

En relación con las funciones que desempeña el sistema cannabinoide endógeno puede decirse que, en general, juega un papel modulador en diferentes procesos fisiológicos, principalmente en el cerebro, aunque también en los sistemas inmune y cardiovascular, así como a nivel del metabolismo energético y a nivel endocrino. En el cerebro, los endocannabinoides participan en la regulación de la actividad motora, la ingesta, la temperatura, el aprendizaje, la memoria y la nocicepción; también desempeñan un papel notable durante el desarrollo cerebral. Estas acciones de los compuestos cannabinoides se han puesto de manifiesto, por un lado, a partir de los datos acerca de la distribución de los receptores CB₁ y de sus ligandos endógenos en el cerebro, y, por otro, de los resultados obtenidos en el análisis de los efectos neurobiológicos, tanto de los cannabinoides sintéticos, como de los presentes en la planta *C. sativa*, y de los propios endocannabinoides, así como por los estudios con animales *knock-out* (Ramos y Fernández-Ruiz, 2003).

De forma resumida, los efectos fisiológicos y farmacológicos que produce la activación de los receptores cannabinoides a nivel del SNC aparecen en la tabla 4, junto con las posibles acciones terapéuticas que podrían tener los compuestos cannabinoides. En relación con las acciones periféricas de los cannabinoides, la tabla 5 muestra un resumen de los principales procesos y sistemas en los que participa el sistema endocannabinoide, y las posibles aplicaciones terapéuticas que se han sugerido para los compuestos cannabinoides.

Tabla 4: Resumen de las principales acciones mediadas a través del sistema endocannabinoide en el SNC y sus potenciales acciones terapéuticas. (LTP, potenciación a largo plazo)

Proceso	Funciones asignadas al SEC	Localización de los receptores CB ₁	Acción terapéutica potencial	Referencia
Actividad motora	Estimulación del movimiento a dosis bajas; inhibición a dosis altas	Ganglios basales, cerebelo, sustancia nigra	Huntington, S. Tourette, Esclerosis Múltiple, Parkinson, Disquinesias	Fernández-Ruiz <i>et al.</i> 2002; Fernández-Ruiz y González, 2005; Lastres-Becker y Fernández-Ruiz, 2006; Sagredo <i>et al.</i> , 2007
Nocicepción	Analgesia espinal y supraespinal	Áreas cerebrales y medulares implicadas en antinocicepción	Dolor neuropático; disminución dosis opioides	Cravatt y Lichtman, 2004
Memoria y aprendizaje	Modulación de la extinción de la memoria y la LTP	Hipocampo	Tratamiento de ciertos trastornos de la memoria (?)	Marsicano <i>et al.</i> , 2002b
Procesos cognitivos	Alteraciones en motivación, emotividad, ansiedad y sistema de recompensa	Corteza cerebral, sistema límbico	Tratamiento estados adictivos	Fernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2004a; Rodríguez de Fonseca <i>et al.</i> , 2005; Lupica y Riegel, 2005; Viveros <i>et al.</i> , 2005
Regulación neuroendocrina	Cambios en la liberación de hormonas adenohipofisarias	Hipotálamo mediobasal	Desconocida	Gammon <i>et al.</i> , 2005; Pagotto <i>et al.</i> , 2006
Procesos neurovegetativos	Regulación de la emesis y la temperatura corporal	Área postrema, núcleos hipotalámicos	↓ náuseas y vómitos pacientes con cancer	Durán y Capellà, 2003; Martin y Wiley, 2004
Control ingesta y apetito	Regulación del apetito y el balance energético	Núcleos hipotalámicos y mecanismos periféricos	↑ apetito pacientes con SIDA Obesidad	Di Marzo y Matias, 2005; Wiley <i>et al.</i> , 2005; Kirkham y Tucci, 2006; Cota, 2008
Desarrollo cerebral	Participación en el desarrollo como moduladores epigenéticos	Diversas áreas del sistema nervioso en desarrollo	Desconocida	Fernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2000; Fernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2004b

Tabla 5: Funciones del sistema endocannabinoide a nivel periférico mediadas por CB₁ o CB₂

Sistema implicado	Presencia receptores cannabinoides	Acción terapéutica potencial	Referencia
Tejidos oculares	CB ₁ en diversas estructuras del ojo	Glaucoma (disminución presión intraocular)	Tomida <i>et al.</i> , 2004; Goicoechea y Martin, 2003
Sistema respiratorio	Epitelio bronquial (?)	Asma (?) (acción broncodilatadora)	Leza y Lorenzo, 2003
Sistema circulatorio	CB ₁ en vasos sanguíneos y corazón	Hipertensión (?) (acción hipotensora)	Leza y Lorenzo, 2003; Randall <i>et al.</i> , 2004
Sistema inmune	Principalmente CB ₂ en casi todos los subtipos celulares	Enfermedades autoinmunes; inflamación crónica	Parolaro <i>et al.</i> , 2002; Klein y Cabral, 2006
Varios tipos de tejidos tumorales	CB ₁ y CB ₂ en células tumorales	Efectos antiproliferativos en diversos tipos de cáncer	Guzmán 2003; Blázquez <i>et al.</i> , 2006

2.8. Sistema endocannabinoide y circuito de recompensa

El sistema endocannabinoide ha sido implicado en la modulación del circuito de recompensa y participa en las propiedades reforzantes y adictivas de todas las drogas de abuso (Maldonado *et al.*, 2006). Estudios neuroanatómicos han revelado que los receptores CB₁ y sus ligandos endógenos son moderadamente abundantes en diferentes áreas cerebrales que han sido relacionadas en la adicción a drogas como la corteza cerebral y áreas límbicas como el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y la amígdala (Herkenham *et al.*, 1991), lo que sugiere su posible implicación en las funciones cognitivas, emocionales y motivacionales (Bisogno *et al.*, 1999). La figura 12 muestra diversas imágenes del sistema endocannabinoide en el circuito de recompensa.

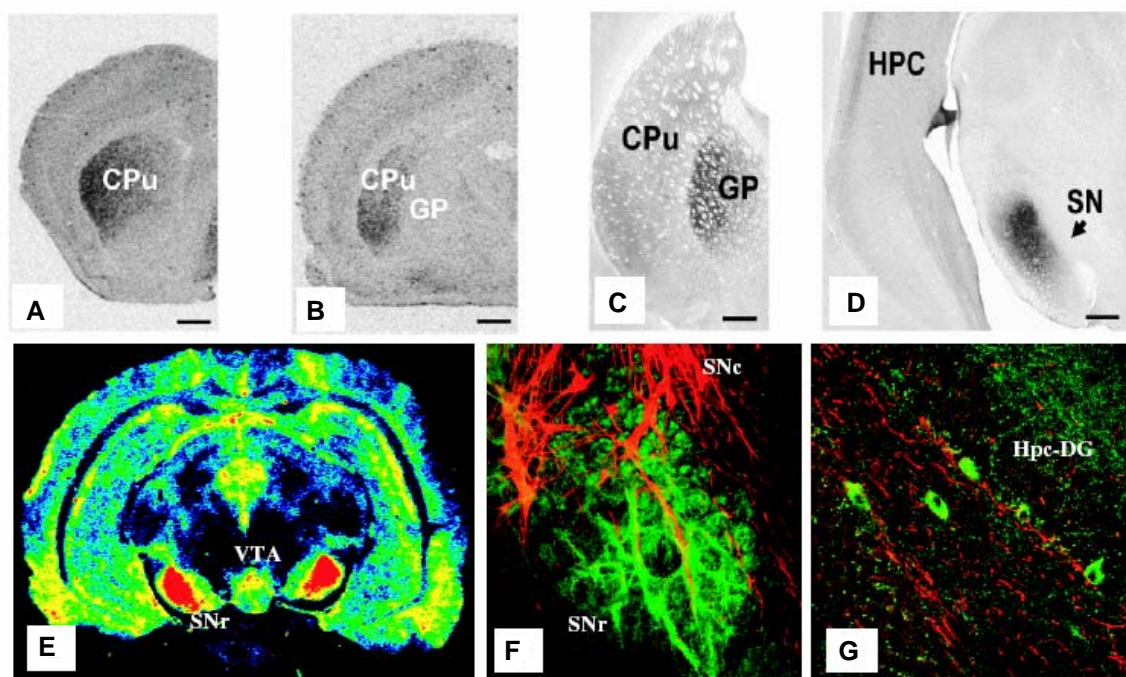


Figura 12: Imágenes del receptor CB₁ en el circuito de recompensa en el cerebro de la rata. En los ganglios basales la expresión del mRNA de CB₁ aparece sobretodo en las neuronas de proyección GABAérgicas (Figuras A y B; hibridación *in situ*): el mensajero se expresa en el caudado-putamen (CPu) pero no en sus núcleos diana, el globo pálido (GP) y sustancia nigra (SN). Por el contrario la proteína sí está presente en estos dos últimos núcleos (figuras C y D; inmunohistoquímica). En la figura E se aprecia la incorporación de GTPγS estimulada por agonistas del receptor CB₁ en la SN y el área tegmental ventral (VTA). La figura F muestra la imagen confocal utilizando anticuerpos para receptores CB₁ (verde) y tirosina hidroxilasa (rojo) en la SN; los receptores CB₁ en esta área se encuentran exclusivamente sobre los aferentes GABAérgicos que llegan a la SN *pars reticulata* (SNr), mientras que las células dopaminérgicas aparecen en la *pars compacta* (SNc). Esta separación entre los receptores CB₁ y la transmisión dopaminérgica también aparece en el hipocampo-giro dentado (Hpc-DG, figura G). (Tomado de Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005).

Estudios con animales *knock-out* para el receptor CB₁ han mostrado que estos animales presentan una sensibilidad reducida al refuerzo proporcionado por sustancias altamente atractivas y reforzantes, como son las sustancias azucaradas (Sanchís-Segura *et al.*, 2004), la morfina (Ledent *et al.*, 1999) o la cocaína (Soria *et al.*, 2005). Además, estudios bioquímicos han mostrado que aparecen cambios en la densidad de los receptores CB₁, así como en los niveles de sus ligandos endógenos en las áreas cerebrales implicadas en el refuerzo, en animales dependientes a la mayoría de drogas de abuso (González *et al.*, 2002a, 2002b; Basavarajappa y Hungund, 2002, 2005). Por otra parte, el control farmacológico de la transmisión endocannabinoide es capaz de modificar las propiedades reforzantes de estímulos tales como la estimulación eléctrica cerebral en ratas (Deroche-Gamonet *et al.*, 2001) o la heroína (Solinas *et al.*, 2003, 2005), así como de influenciar varios de los signos indicativos de la adicción a drogas de abuso, como son la vulnerabilidad individual, el deseo (*craving*), el grado de dependencia, la intensidad de la abstinencia o el riesgo de recaída (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Gallate *et al.*, 1999; Gallate y McGregor, 1999; Solinas *et al.*, 2003; De Vries y Schoffelmeer, 2005).

2.9. Acciones a nivel molecular de los cannabinoides sobre el circuito de recompensa

Además de la regulación a corto plazo, ya mencionada, sobre la potencia de la sinapsis que ejercen los endocannabinoides a través de su actuación como mensajeros retrógrados, parece ser que los cannabinoides endógenos son necesarios en ciertas formas de plasticidad sináptica a largo plazo, como la depresión a largo plazo (*long-term depression*, o LTD) de la liberación de glutamato en áreas como el núcleo accumbens y el estriado dorsal (Lupica *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2003b). Dado el importante papel que estas estructuras cerebrales juegan en la mediación de los efectos reforzantes de las drogas de abuso, se ha propuesto que la dependencia de los endocannabinoides para que se produzca la LTD en el núcleo accumbens podría representar una adaptación celular que estaría implicada en la progresión que se da desde el uso casual de una droga hasta la adicción a la misma (Hoffman *et al.*, 2003a), es decir, en el camino que hay entre el uso y el abuso de una sustancia (Lupica y Riegel, 2005).

Se han llevado a cabo varios estudios para dilucidar los efectos del Δ^9 -THC y otros agonistas cannabinoides sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, así como sobre los niveles de dopamina en las zonas donde se encuentran los terminales axónicos de estas células. Estos estudios han demostrado que los agonistas cannabinoides, cuando son administrados intracerebroventricularmente en roedores tanto

anestesiados como no anestesiados, son capaces de aumentar la actividad de las neuronas dopaminérgicas, incluyendo tanto un aumento en la línea basal de tasas de disparos, como un incremento en la frecuencia de potenciales de acción “en ráfagas” (Lupica y Riegel, 2005). Del mismo modo, este efecto se observa también en las preparaciones *in vitro* de secciones cerebrales en las que se incluye el área tegmental ventral, lo que sugiere que los agonistas cannabinoides estarían actuando a través de circuitos neuronales locales en la propia área tegmental ventral (Cheer *et al.*, 2000). Este aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral inducido por los cannabinoides es, aparentemente, responsable de los altos niveles de dopamina observados en el núcleo accumbens, puesto que no se observa ningún efecto de los agonistas cannabinoides sobre la concentración extracelular de dopamina cuando se inyectan estos compuestos directamente en el núcleo accumbens (Szabo *et al.*, 1999). Además, se cree que las neuronas dopaminérgicas no expresan receptores CB₁, puesto que no se han encontrado ni la proteína ni el mRNA de CB₁ (Herkenham *et al.*, 1991; Matsuda *et al.*, 1993; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005). Sin embargo, Wenger *et al.* (2003), sí han descrito colocalización de CB₁ y la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en distintas áreas implicadas en el refuerzo. El conjunto de estos resultados hace pensar que los efectos del Δ^9 -THC y otros cannabinoides se producen sobre los circuitos neuronales locales del área tegmental ventral (Lupica y Riegel, 2005).

En el área tegmental ventral existen, al menos, otros dos fenotipos neuronales además de las neuronas dopaminérgicas. Un número importante de estas neuronas no-dopaminérgicas son las neuronas GABAérgicas, que envían eferencias al núcleo accumbens y a la corteza prefrontal. Se ha propuesto que estas neuronas supondrían un importante *input* inhibitorio para las neuronas dopaminérgicas, vía activación de los receptores GABA_A situados en estas neuronas, a través de colaterales que emiten estas proyecciones GABAérgicas. Las neuronas opioidérgicas son el segundo fenotipo importante en esta región. Puesto que los opioides aumentan la actividad de las neuronas dopaminérgicas a través de un mecanismo desinhibidor que implica la inhibición de las neuronas GABAérgicas presentes en los circuitos locales, y que los receptores CB₁ median este efecto en todo el cerebro, se ha sugerido que éste puede ser también uno de los mecanismos implicados en el caso del área tegmental ventral (Lupica y Riegel, 2005).

Se ha propuesto que la desinhibición dopaminérgica de las neuronas de área tegmental ventral dependiente de cannabinoides podría ser debida a dos mecanismos de acción. El primero implicaría a los receptores CB₁ situados sobre los terminales axónicos GABAérgicos pertenecientes a neuronas situadas en la propia área tegmental ventral; la liberación de GABA

por estas neuronas produciría la inhibición de las neuronas dopaminérgicas a través de su unión a receptores de tipo GABA_A (Szabo *et al.*, 2002). En el segundo mecanismo participarían las neuronas GABAérgicas procedentes de otras áreas distintas del área tegmental ventral, tales como el núcleo accumbens, el pálido ventral y el núcleo pedúnculo pontino. El GABA liberado por estos axones se une preferentemente a receptores de tipo GABA_B. Experimentos realizados con técnicas electrofisiológicas han mostrado que los receptores CB₁ se encuentran sobre terminales GABAérgicas aferentes y que estos terminales liberan GABA que se une a receptores GABA_B que se encuentran en la superficie de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Riegel y Lupica, 2004). La activación del receptor CB₁ actuaría, de este modo, modulando los *inputs* GABAérgicos que llegan a las neuronas dopaminérgicas de esta región a través de su acción sobre los receptores GABA_B, y de esta forma el Δ⁹-THC y otros compuestos cannabinoides actuarían desinhibiendo a las neuronas dopaminérgicas y, finalmente, provocando el aumento en los niveles de dopamina que se observa también tras el consumo de las demás drogas de abuso y que se corresponde con las propiedades reforzantes de esta droga observadas tanto en animales como en humanos (Lupica y Riegel, 2005).

Por otro lado, la alta actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral provoca la liberación de endocannabinoides por parte de estas células, endocannabinoides que actúan simultáneamente inhibiendo no solo a las neuronas GABAérgicas que proceden de otras áreas distintas del área tegmental ventral, sino que también inhiben a las aferencias glutamatérgicas. Los experimentos realizados sugieren que es probable que esta liberación de endocannabinoides se produzca como consecuencia de la actividad sináptica “en ráfagas” *in vivo*, condición que solo se da en condiciones fisiológicas en presencia de una estimulación extraordinaria (como la que se produce cuando se procesa un estímulo placentero muy fuerte), y por tanto que los endocannabinoides serían liberados en presencia de drogas de abuso que aumentarían la actividad de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral. Es probable que esta liberación de endocannabinoides desde las neuronas dopaminérgicas sea común a las acciones de una amplia variedad de drogas de abuso (Lupica y Riegel, 2005).

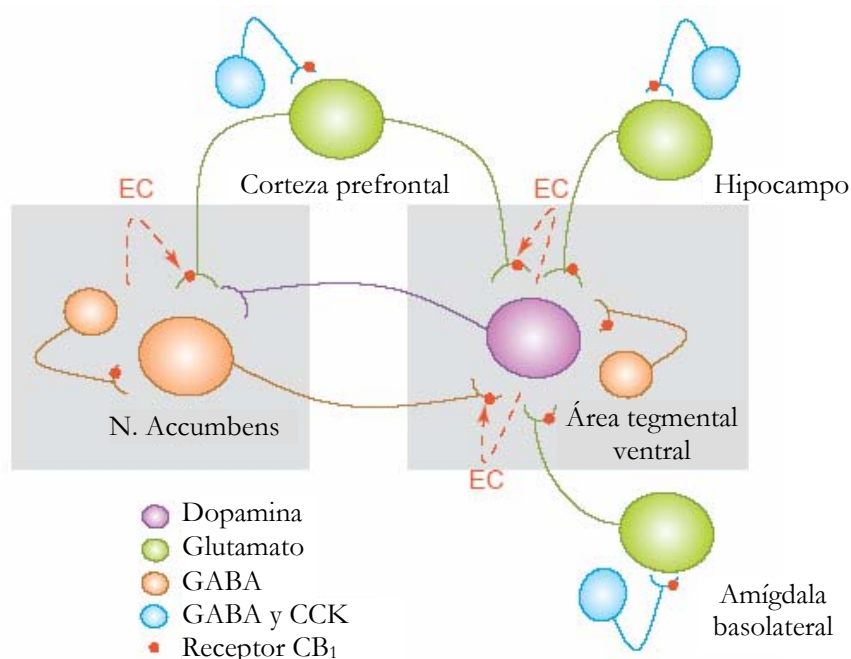


Figura 13. Posibles sitios de acción de los endocannabinoides en la modulación de los efectos reforzantes. En el área tegmental ventral (VTA), los receptores CB₁ se localizan en terminales presinápticas GABAérgicas y glutamatergicas. Por el contrario, las neuronas dopaminérgicas del VTA no expresan receptores CB₁. La activación de los receptores CB₁ en el VTA por los endocannabinoides (EC) produce la inhibición de la liberación de GABA, eliminando así el efecto inhibitorio de las células GABAérgicas sobre las neuronas dopaminérgicas. Además, el aumento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas induce la liberación de endocannabinoides por parte de estas mismas células; estos endocannabinoides, actuando como mensajeros retrógrados sobre los receptores CB₁ presinápticos, inhiben tanto los *inputs* inhibitorios GABAérgicos como los glutamatergicos excitatorios que llegan a las neuronas dopaminérgicas del VTA. Las aferencias glutamatergicas que llegan desde la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo (HIP), implicadas en la motivación y los procesos mnésicos relacionados con los efectos reforzantes de las drogas, también están bajo el control de los receptores CB₁, a través de un efecto inhibitorio sobre neuronas presinápticas inhibitorias que liberan GABA y colecistoquinina (CCK). En el núcleo accumbens (NAc), los endocannabinoides se comportan como moduladores retrógrados, actuando principalmente sobre receptores CB₁ situados en los terminales axónicos de neuronas glutamatergicas. La subsecuente inhibición de la liberación de glutamato inhibe las neuronas GABAérgicas que parten del NAc y que proyectan al VTA, por lo que activan, de forma indirecta, a las neuronas dopaminérgicas. Los endocannabinoides también participan en la plasticidad sináptica en el NAc. Así, la activación repetitiva de los aferentes glutamatergicos prefrontales que llegan al NAc resulta en la depresión a largo plazo (LTD) de esta transmisión excitatoria, que depende de los endocannabinoides y los receptores CB₁. La liberación de endocannabinoides en el VTA participa en la modulación de los efectos reforzantes de las drogas, lo que explicaría la implicación de los receptores CB₁ en las propiedades reforzantes no solo del alcohol, sino también de los opioides, el Δ^9 -THC y la nicotina (A partir de Maldonado *et al.*, 2006).

Las verdaderas consecuencias de la modulación de la actividad de las aferencias (tanto glutamatérgicas como GABAérgicas) que llegan a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral en función de la actividad que éstas reciben (por parte de esas mismas aferencias) son desconocidas por el momento. Este desconocimiento deriva del hecho de que tanto las aferencias inhibitorias GABAérgicas como las excitatorias glutamatérgicas que llegan a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral pueden ser inhibidas simultáneamente por los endocannabinoides liberados, que actúan sobre receptores CB₁ localizados sobre estos terminales axónicos. La contribución de la regulación GABAérgica y glutamatérgica dependiente de cannabinoides sobre la actividad de estas neuronas dopaminérgicas dependerá del nivel relativo de activación de ambas vías aferentes, bajo distintas circunstancias comportamentales (Riegel y Lupica, 2004). La inhibición presináptica de la liberación de GABA en el área tegmental ventral por parte de los endocannabinoides podría ser crítica en el incremento de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens; de forma similar, la acción de los endocannabinoides sobre los aferentes glutamatérgicos que llegan al área tegmental ventral participaría en la mayor activación de las aferencias corticales al área tegmental ventral, por ejemplo, como ocurre en los procesos de sensibilización a psicoestimulantes (Lupica y Riegel, 2005).

2.10. Alcohol y sistema cannabinoide endógeno

El conjunto de estudios realizados (genéticos, bioquímicos y farmacológicos) sugieren un importante papel del sistema endocannabinoide en el circuito de recompensa cerebral y, por tanto, en las propiedades reforzantes de la mayoría de drogas de abuso, incluyendo el alcohol. Sin embargo, el sistema cannabinoide endógeno participa de forma importante no sólo en los procesos de refuerzo, sino también en la vulnerabilidad individual, en la adquisición del comportamiento de autoadministración de alcohol, en el desarrollo de tolerancia durante el consumo crónico, así como en el desarrollo de dependencia/abstinencia y en la recaída al alcohol (Fernández-Ruiz *et al.*, 2004a). Además, el sistema endocannabinoide participa no sólo en las acciones centrales del alcohol, sino también en las periféricas (distribución y absorción del alcohol ingerido).

a) Evidencias genéticas

En humanos se ha tratado de relacionar, aunque sin éxito, una mayor frecuencia de aparición de un polimorfismo del receptor CB₁ con el desarrollo de alcoholismo en la población de alcohólicos en general; sin embargo, subpoblaciones concretas de alcohólicos (aquellos que presentan síndromes de abstinencia severos, o antecedentes de déficit de

atención o hiperactividad infantiles) sí han mostrado mayores frecuencias de aparición de este polimorfismo (Schmidt *et al.*, 2002; Ponce *et al.*, 2003). El receptor CB₂ también ha sido objeto de análisis en los últimos años, y se ha descrito una asociación entre el polimorfismo Q63R del receptor CB₂ y el alcoholismo en una población japonesa (Ishiguro *et al.*, 2007).

Con respecto a los estudios en animales de laboratorio, las evidencias genéticas de la implicación del sistema endocannabinoide se basan en la existencia de estirpes con distinta preferencia por el alcohol. El distinto grado de preferencia está acompañado por diferencias en la funcionalidad de algunos de los elementos que forman parte del sistema endocannabinoide. Por un lado, se han descrito diferencias en cuanto a la densidad y/o la funcionalidad de los receptores CB₁, aunque los resultados descritos hasta el momento son controvertidos. En los cerebros de ratones preferentes por el alcohol de la estirpe C57BL/6 aparece una menor densidad de receptores CB₁, aunque esta menor densidad se ve compensada por una mayor funcionalidad de estos receptores, cuando se comparan con los cerebros de ratones no preferentes DBA/2 (Hungund y Basavarajappa, 2000; Basavarajappa y Hungund, 2001). Por el contrario, en la estirpe de ratas preferentes Fawn Hooded aparece tanto una menor expresión como una menor funcionalidad de los receptores CB₁, cuando se comparan con la estirpe Wistar (Ortiz *et al.*, 2004a). Por otra parte, recientemente también el receptor CB₂ ha sido analizado con respecto a la preferencia por el alcohol en ratones, encontrándose una correlación negativa entre la preferencia por el alcohol y la expresión de este receptor (Ishiguro *et al.*, 2007).

Los estudios realizados sobre animales *knock-out* para el receptor CB₁ han puesto de manifiesto la implicación del sistema endocannabinoide en diversos aspectos de la adicción al alcohol, si bien también aquí se encuentran discrepancias en los resultados obtenidos. Con respecto al consumo voluntario, se ha descrito que los ratones CB₁^{-/-} presentan un menor consumo y preferencia por el alcohol (Hungund *et al.*, 2003; Naasila *et al.*, 2004); además del consumo disminuido de alcohol, en estos animales no se presenta la característica liberación de dopamina en el núcleo accumbens propia del consumo de alcohol y otras drogas de abuso (Hungund *et al.*, 2003). Asimismo, el menor consumo de alcohol se vió acompañado de una mayor sensibilidad a los efectos agudos del alcohol, así como de una mayor severidad de los síntomas del síndrome de abstinencia (Naasila *et al.*, 2004). Por el contrario, el grupo de Racz ha descrito en ratones CB₁^{-/-} la ausencia de síntomas del síndrome de abstinencia tras el consumo crónico de alcohol, probablemente debido a diferencias en el background genético de la estirpe de animales utilizada en cada caso. Por otra parte, en estos animales los efectos agudos del alcohol, así como el desarrollo de tolerancia a la droga resultaron ser normales. En

este mismo trabajo se describió la implicación del sistema endocannabinoide en la recaída al alcohol, puesto que se observó que el estrés (inducido por descargas eléctricas en las patas del animal) no fue capaz de provocar la recaída (Racz *et al.*, 2003). Por último, se ha implicado también a los receptores CB₁ en los mecanismos periféricos de absorción y distribución del alcohol, ya que se ha encontrado un mayor nivel de alcohol en sangre tras la inyección de dosis altas de etanol en animales *knock-out* para CB₁, comparados con animales *wild-type* (Lallemant y De Witte, 2005).

Recientemente se ha descrito la importancia de la enzima encargada de la degradación de los endocannabinoides, FAAH, en la adicción al alcohol. Los animales *knock-out* para FAAH, que poseen niveles más altos de anandamida, presentan una mayor preferencia por el alcohol y consumen de forma voluntaria mayores cantidades de esta sustancia que los animales *wild-type* (Basavarajappa *et al.*, 2006; Blednov *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2008). En concordancia con estos resultados, se ha descrito recientemente que la actividad de la FAAH estaría disminuída en animales con fenotipo de alta preferencia por el alcohol (Hansson *et al.*, 2007).

La tabla 6 muestra el resumen de las evidencias genéticas encontradas que implican al sistema endocannabinoide en el alcoholismo.

b) Evidencias bioquímicas

Varios de los elementos que forman parte del sistema endocannabinoide han sido estudiados en relación con la adicción al alcohol. Los estudios realizados hasta el momento muestran modificaciones a nivel de los receptores CB₁ tanto tras el consumo agudo como crónico de alcohol, así como durante la fase de abstinencia. En el caso de la exposición aguda, se ha descrito recientemente una reducción en la expresión de estos receptores en diversas áreas cerebrales de ratas (Oliva *et al.*, 2008). Por su parte, los resultados en el caso de la exposición crónica son controvertidos. Se han descrito regulación a la baja y desensibilización de los mecanismos de transducción de señales a través de estos receptores tras la exposición crónica al alcohol en cerebros de ratones C57BL/6 (Basavarajappa y Hungund, 1999a). De acuerdo con estos resultados, se ha referido un descenso en la expresión del receptor CB₁ tras la exposición crónica forzada al alcohol en distintas áreas cerebrales de ratas Wistar (Ortiz *et al.*, 2004b). Sin embargo, en otro estudio realizado también con ratas Wistar no se encontraron modificaciones en la expresión del ARNm o en el *binding* de CB₁ tras el consumo crónico de alcohol (González *et al.*, 2002a); la razón de estas diferencias no está clara, aunque quizás sea debida a los distintos protocolos de administración del alcohol utilizados o a la duración del tiempo de alcoholización. Con respecto a la fase de abstinencia al alcohol, se han publicado resultados tras dos tipos de protocolos de administración de alcohol. En un protocolo de

administración de alcohol crónico (72 horas) seguido de 24 horas de abstinencia, Vinod *et al.* (2006) han descrito la recuperación de los niveles de CB₁ en la citación de abstinencia hasta los niveles controles. Sin embargo, Mitirattanakul *et al.*, siguiendo un protocolo de administración intermitente de alcohol (alternando ciclos de alcoholización y abstinencia) han mostrado primero un descenso en los niveles de CB₁ tras 2 días de abstinencia, y posteriormente un incremento a largo plazo (40 días) (Mitirattanakul *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha sugerido que la menor preferencia por el alcohol que se produce con la edad podría estar asociada al descenso en la funcionalidad de los receptores CB₁ en áreas del sistema límbico (Wang *et al.*, 2003).

En relación con los niveles de endocannabinoides, se han descrito cambios opuestos en función del tiempo de exposición al alcohol. Así, el contenido de anandamida y PEA aparece disminuido tras una exposición aguda (Ferrer *et al.*, 2007), mientras que se ha referido un aumento de la producción de endocannabinoides tanto *in vitro* como *in vivo* tras la exposición crónica al alcohol (Basavarajappa y Hungund, 1999b, 2002; Basavarajappa *et al.*, 2003; González *et al.*, 2002b; 2004). *In vivo*, se ha observado un aumento significativo de anandamida en el cerebro anterior, donde se encuentran estructuras del sistema límbico, y un descenso en el cerebro medio, región donde se encuentra el área tegmental ventral (González *et al.*, 2002b), por lo que se ha sugerido que la hiperactividad de la transmisión endocannabinoide podría estar implicada en las propiedades adictivas del alcohol y otras drogas de abuso (Fernández-Ruiz *et al.*, 2004). Durante la fase de abstinencia al alcohol, por el contrario, se ha descrito un descenso en los niveles de endocannabinoides, sin que aparezcan modificaciones en la densidad de receptores CB₁ (González *et al.*, 2004); el descenso del contenido de endocannabinoides es aún más marcado cuando se restablece el consumo de alcohol tras la abstinencia (González *et al.*, 2004).

Con respecto a los hallazgos en humanos, se ha descrito una hiperactividad del sistema endocannabinoide en alcohólicos suicidas, comparados con alcohólicos no suicidas (Vinod *et al.*, 2005), aunque las diferencias encontradas por estos autores serían atribuibles más al hecho del suicidio que al alcoholismo.

En la tabla 7 se muestra un resumen de los estudios en el campo de la bioquímica que implican al sistema endocannabinoide en el alcoholismo.

c) Evidencias farmacológicas

Las evidencias farmacológicas que relacionan el sistema cannabinoide con el alcoholismo se han obtenido al estudiar la capacidad de distintos compuestos capaces de

actuar sobre diversos puntos de este sistema para modular diversos aspectos del proceso de adicción al alcohol (ver tabla 8).

Por una parte, los estudios con los agonistas cannabinoides WIN55,212-2 y CP55,940 han mostrado que la activación de los receptores CB₁ es capaz de estimular la ingesta de alcohol en ratas preferentes Sardinian (sP) (Colombo *et al.*, 2002b; 2004a); asimismo el CP55,940 también produce un aumento del deseo de beber en ratas (Gallate *et al.*, 1999). Por otra parte, el WIN55,212-2, administrado durante la privación del alcohol, es capaz de provocar un aumento en la duración del ADE (López-Moreno *et al.*, 2004). Por el contrario, los experimentos realizados con el antagonista del receptor CB₁ SR141716 (Rimonabant) han mostrado que éste produce una reducción del consumo de alcohol en distintas estirpes de roedores (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Freedland *et al.*, 2001); además, es capaz de disminuir el deseo (*craving*) de beber en ratas (Gallate y McGregor, 1999), y puede impedir la adquisición del comportamiento de ingesta de alcohol en ratas preferentes sP (Serra *et al.*, 2001). Administrado durante la abstinencia, el SR141716 reduce la preferencia por el alcohol; sin embargo, administrado durante la alcoholización la aumenta (Lallemant *et al.*, 2001). Se ha descrito también que el SR14716 es capaz de suprimir el ADE (*alcohol-deprivation effect*) en ratas preferentes sP (Serra *et al.*, 2002), y, en esta misma estirpe, se ha descrito igualmente la capacidad de este fármaco para suprimir las propiedades reforzantes del alcohol (Colombo *et al.*, 2004b). También el nuevo antagonista del receptor CB₁, SR147778, es capaz de suprimir la ingesta, las propiedades motivacionales del alcohol en ratas preferentes sP (Gessa *et al.*, 2005), así como la preferencia por el alcohol en ratas Wistar (no-preferentes) (Lallemant y De Witte, 2006).

Recientemente se han abierto nuevas vías en el estudio de una posible farmacoterapia con cannabinoides para el alcoholismo, ya que se ha evaluado el potencial terapéutico de fármacos que actúan sobre el sistema endocannabinoide no de forma directa, esto es, no a través de la estimulación directa de los receptores CB₁ con agonistas sintéticos (con el consiguiente riesgo de efectos psicoactivos), sino de forma indirecta. En particular, se ha sugerido que la inhibición del transportador de anandamida podría ser efectiva en el tratamiento del alcoholismo, ya que la administración aguda de AM404 es capaz de reducir la autoadministración de alcohol (Cippitelli *et al.*, 2007). Otra de las evidencias farmacológicas que implican al sistema endocannabinoide en la adicción al alcohol es la capacidad del inhibidor de la FAAH URB597 para potenciar la preferencia y el consumo de alcohol tanto en rata como en ratón (Blednov *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2008; Hansson *et al.*, 2007).

Tabla 6: Evidencias genéticas que ponen de manifiesto la implicación del sistema endocannabinoide en el alcoholismo.

Estudio	Resultado	Referencia
Humanos: Polimorfismos CB ₁	Mayor frecuencia de aparición de los polimorfismos del receptor CB ₁ en subpoblaciones de alcohólicos (aquellos con síndromes de abstinencia severos o con antecedentes infantiles del síndrome de déficit atención/hiperactividad)	Schmidt <i>et al.</i> , 2002; Ponce <i>et al.</i> , 2003
Humanos: Polimorfismo CB ₂	Asociación entre el polimorfismo Q63R del receptor CB ₂ y el alcoholismo en una población japonesa	Ishiguro <i>et al.</i> , 2007
Ratones CB ₁ ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos agudos etanol normales • Tolerancia y dependencia normales • No presentan abstinencia • El estrés no es capaz de provocar recaída 	Racz <i>et al.</i> , 2003
	<ul style="list-style-type: none"> • Menor consumo voluntario de alcohol • No hay liberación de dopamina en el N. accumbens tras el consumo de alcohol 	Hungund <i>et al.</i> , 2003
	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor sensibilidad efectos agudos alcohol • Menor consumo y preferencia • Mayor severidad del síndrome de abstinencia 	Naasila <i>et al.</i> , 2004
	Mayor nivel de alcohol en sangre tras la inyección de dosis altas de etanol <i>vs. wild-type</i> (implicación de CB ₁ en los mecanismos periféricos de absorción/distribución del alcohol)	Lallemand y De Witte, 2005
	Reducción de las propiedades reforzantes del alcohol	Houchi <i>et al.</i> , 2005
Ratones FAAH ^{-/-}	Aumento de la preferencia por el alcohol	Basavarajappa <i>et al.</i> , 2006; Blednov <i>et al.</i> , 2007
	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor preferencia por el alcohol • Menor sensibilidad a los efectos sedativos e hipotérmicos del alcohol agudo • Menor severidad de las convulsiones inducidas durante el síndrome de abstinencia 	Vinod <i>et al.</i> , 2008
Estirpes preferentes por el alcohol	Menor densidad, pero mayor funcionalidad de los receptores CB ₁ , en la estirpe de ratones preferentes C57BL/6 <i>vs.</i> DBA/2 (no preferentes)	Hungund y Basavarajappa, 2000; Basavarajappa y Hungund, 2001
	Menor expresión y funcionalidad receptores CB ₁ en ratas preferentes Fawn Hooded <i>vs.</i> Wistar	Ortiz <i>et al.</i> , 2004a
	Menor densidad y funcionalidad receptores CB ₁ ; menor expresión y funcionalidad de la FAAH en ratas preferentes AA <i>vs.</i> ANA (no preferentes)	Hansson <i>et al.</i> , 2007

Tabla 7: Evidencias bioquímicas que implican al sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo.

Estudio	Resultado	Referencia
Receptores CB ₁	<i>Downregulation</i> y desensibilización de los mecanismos de transducción de CB ₁ tras la exposición crónica a alcohol (membranas sinápticas de ratón)	Basavarajappa <i>et al.</i> , 1998; Basavarajappa y Hungund, 1999a
	No hay cambios en la expresión ni en el binding de CB ₁ tras exposición crónica a alcohol (ratas Wistar)	González <i>et al.</i> , 2002a
	Descenso en la expresión de CB ₁ tras exposición crónica a alcohol en diversas áreas cerebrales (rata)	Ortiz <i>et al.</i> , 2004b
	Descenso densidad y funcionalidad CB ₁ , aumento anandamida y descenso en la actividad de la FAAH en diversas áreas cerebrales tras exposición crónica al alcohol. Recuperación niveles CB ₁ , anandamida y actividad de FAAH tras 24h de abstinencia	Vinod <i>et al.</i> , 2006
	Disminución expresión CB ₁ en distintas áreas cerebrales tras la administración aguda de alcohol (rata)	Oliva <i>et al.</i> , 2008
	Disminución en los niveles de CB ₁ a corto plazo y aumento tras periodos prolongados de abstinencia	Mitrirattanakul <i>et al.</i> , 2007
	Menor preferencia por el alcohol con la edad asociada a un descenso en la funcionalidad de CB ₁ en sistema límbico	Wang <i>et al.</i> , 2003
Receptores CB ₂	Correlación negativa entre preferencia por el alcohol y expresión de CB ₂ en ratones	Ishiguro <i>et al.</i> , 2007
Transportador de anandamida	Inhibición del transportador de anandamida tras la administración crónica de alcohol (<i>in vitro</i>)	Basavarajappa <i>et al.</i> , 2003
Niveles EC (<i>in vitro</i>)	Aumento producción de EC tras la exposición crónica a alcohol	Basavarajappa y Hungund, 1999b, 2002
Niveles EC (<i>in vivo</i>)	Modificaciones en EC en las distintas etapas de la exposición al alcohol (aumentan durante la alcoholización y disminuyen durante abstinencia)	González <i>et al.</i> , 2002b, 2004
	Reducción niveles de anandamida y PEA en hipocampo, cerebelo y estriado ventral tras administración aguda de alcohol	Ferrer <i>et al.</i> , 2007
Actividad receptores CB ₁ y niveles EC (humanos)	Hiperactividad del sistema endocannabinoide en alcohólicos suicidas <i>versus</i> no suicidas	Vinod <i>et al.</i> , 2005

Tabla 8: Evidencias farmacológicas que ponen de manifiesto la implicación del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo. (sP: ratas preferentes Sardinian; ADE: alcohol deprivation effect) (WIN55,212-2, CP55,940: agonistas CB1; SR141716, SR147778: antagonistas CB1; AM404: inhibidor transportador anandamida; URB597: inhibidor FAAH)

Tratamiento	Resultado	Referencia
Agonistas cannabinoides (WIN55,212-2 y CP55,940)	Estimulación de la ingesta de alcohol (ratas sP)	Colombo <i>et al.</i> , 2002b, 2004a
CP55,940	Aumenta el deseo de beber (<i>craving</i>) en ratas	Gallate <i>et al.</i> , 1999
WIN55,212-2	Administrado durante la privación, produce mayor duración del ADE	López-Moreno <i>et al.</i> , 2004
SR141716	Reducción del consumo de alcohol en distintas estirpes de roedores	Arnone <i>et al.</i> , 1997; Colombo <i>et al.</i> , 1998; Freedland <i>et al.</i> , 2001
	Disminución del deseo (<i>craving</i>) de beber	Gallate y McGregor, 1999
	Previene la adquisición del comportamiento de ingesta de alcohol (ratas preferentes sP)	Serra <i>et al.</i> , 2001
	Administrado durante la abstinencia disminuye la posterior preferencia por el alcohol; administrado durante la alcoholización la aumenta	Lallemant <i>et al.</i> , 2001
	Supresión del ADE (ratas preferentes sP)	Serra <i>et al.</i> , 2002
	Supresión de las propiedades motivacionales del alcohol (ratas preferentes sP)	Colombo <i>et al.</i> , 2004b
	Reducción de la ingesta de alcohol (ratas preferentes AA)	Hansson <i>et al.</i> , 2007
SR147778	Supresión de la ingesta y las propiedades motivacionales del alcohol (ratas sP)	Gessa <i>et al.</i> , 2005
	Supresión de la preferencia por el alcohol en ratas Wistar (no-preferentes)	Lallemant y De Witte, 2006
AM404	Inhibición de la autoadministración de alcohol (ratas Wistar)	Cippitelli <i>et al.</i> , 2007
URB597	Aumento de la preferencia por el alcohol (ratón)	Blednov <i>et al.</i> , 2007; Vinod <i>et al.</i> , 2008
	Aumento de la autoadministración de alcohol cuando se inyecta en el cortex prefrontal (ratas Wistar)	Hansson <i>et al.</i> , 2007

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Como se ha descrito en la introducción, numerosas evidencias (genéticas, bioquímicas y farmacológicas) relacionan al sistema cannabinoide en ciertas áreas del cerebro con el desarrollo del alcoholismo. Sin embargo, existen diferentes aspectos de esta relación que no han sido aún completamente esclarecidos. En base a esta idea se ha definido la hipótesis central de esta tesis doctoral, que pretende de forma global profundizar en las bases bioquímicas y farmacológicas que sustentan que el sistema cannabinoide tiene una función en los mecanismos neurobiológicos que subyacen al desarrollo del alcoholismo. Concretamente, nos proponemos abordar los siguientes 5 objetivos:

1. Analizar las modificaciones inducidas tras la exposición aguda al alcohol (24 horas) en los niveles de endocannabinoides, expresión de la enzima FAAH y los niveles del receptor CB₁.
2. Determinar las variaciones producidas en la expresión del receptor CB₁ y de la FAAH durante el consumo crónico de alcohol o durante la abstinencia tras varios ciclos de alcoholización y abstinencia.
3. Analizar el estado de los receptores CB₁ y la expresión de la enzima FAAH en diversas áreas cerebrales de sujetos alcohólicos, comparándolos con diversos controles.
4. Evaluar el posible efecto beneficioso del antagonista CB₁ rimonabant (SR141716) sobre la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica temprana, y analizar los mecanismos neuroquímicos implicados en este efecto.
5. Estudiar el potencial neuroprotector de los cannabinoides en un modelo *in vitro* de excitotoxicidad durante abstinencia a alcohol.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

DISEÑO EXPERIMENTAL #1: Efectos de la exposición aguda al alcohol sobre los niveles de endocannabinoides, expresión de FAAH y niveles del receptor CB₁

Como se mencionado en la Introducción, a pesar de los numerosos estudios realizados para analizar los cambios producidos en el sistema endocannabinoide tras la administración prolongada de alcohol, se han publicado muy pocos artículos acerca de las variaciones producidas en este sistema como consecuencia de una exposición aguda al alcohol. Es por este motivo que el primer objetivo de la presente tesis doctoral fue analizar con más profundidad los cambios que se producen tras una exposición al alcohol a corto plazo en los niveles de endocannabinoides “clásicos” (anandamida y 2-AG) y las “moléculas *entourage*” (NAEs), así como los efectos sobre la principal enzima de degradación de endocannabinoides (FAAH), y sobre el receptor CB₁.

Para realizar este experimento se procedió, en primer lugar, a la cuantificación de la concentración de endocannabinoides y varias NAEs relacionadas en varias regiones cerebrales implicadas en el estrés y la emotividad, el control motor y la ingesta en animales expuestos durante 24 horas al alcohol. En segundo lugar, se analizaron mediante *western blot* las posibles variaciones en los niveles de FAAH y del receptor CB₁ en estas mismas áreas cerebrales.

Animales y condiciones experimentales

Los animales utilizados fueron ratas macho adultas, cepa Sprague-Dawley. Este diseño experimental fue realizado en dos etapas, de forma que los primeros experimentos fueron realizados en la Universidad de Indiana en Bloomington (IN); en este caso se emplearon animales de aproximadamente 500g de peso cuyo mantenimiento tuvo lugar en el Animalario de la Facultad de Psicología de la Universidad de Indiana en Bloomington (USA), siguiendo las normas del *National Institutes of Health (USA)* para el cuidado animal y la experimentación. La segunda etapa en el desarrollo de este objetivo se llevó a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, utilizándose también ratas Sprague-Dawley de entre 300-350g de peso (edad superior a 10 semanas), siguiendo siempre las normas de la Unión Europea para el cuidado animal (directiva 86/609/EEC). Las condiciones ambientales de ambos estabularios se mantuvieron constantes, con una temperatura de 22 ± 1 ° C, una humedad relativa de $50 \pm 1\%$ y un fotoperíodo de 12 horas, comenzando la fase lumínica a las 07:00 horas. El acceso a la comida fue libre. El alcohol fue administrado a los animales

disuelto en el agua de bebida (8% v/v), según el procedimiento descrito por Uzbay *et al.* (2000). El periodo de exposición al alcohol fue de 24 horas. Los animales control recibieron únicamente agua. Todos los detalles que confirman la utilidad de este método para desarrollar condiciones experimentales de consumo de alcohol han sido previamente publicados (González *et al.*, 2002a y 2002b).

Obtención de muestras

Tras 24 horas desde el inicio de la exposición al alcohol, los animales fueron sacrificados por decapitación. En los experimentos dirigidos al análisis por *western blot* de FAAH y CB₁, una vez extraídos los cerebros, éstos fueron congelados en hielo seco y almacenados a -80°C hasta el momento del análisis. En el caso de los análisis del contenido en endocannabinoides, tras la extracción del cerebro se realizó la disección en frío del hipotálamo, la amígdala, el caudado-putamen y la corteza prefrontal. Las muestras fueron pesadas y almacenadas en tubos eppendorf que contenían metanol frío a -80°C hasta la extracción lipídica y el posterior análisis. Todo el procedimiento se realizó en menos de 10 minutos, un tiempo significativamente menor que el requerido para que comience la generación post mortem de 2-AG y AEA (Kempe *et al.*, 1996).

DISEÑO EXPERIMENTAL #2: Estudio de los efectos del alcohol tras dos tipos de patrones de administración: consumo crónico ininterrumpido o consumo intermitente, sobre los niveles de expresión del receptor CB1 y la enzima FAAH

Como se mencionó en la introducción, en los últimos años, varios estudios han analizado los cambios producidos en el sistema endocannabinoide tras la administración crónica de alcohol. La mayoría de estos análisis han evaluado los efectos del tratamiento prolongado y continuo con alcohol y han descrito cambios que podrían sugerir una sobreactividad del sistema endocannabinoide cuando el alcohol está presente de forma crónica en el cerebro (Basavarajappa *et al.*, 1998; Basavarajappa y Hungund, 1999a, 2002; González *et al.*, 2002b; 2004 Ortiz *et al.*, 2004). Sin embargo, muy pocos estudios (Mitrirattanakul *et al.*, 2007) han tratado de estimar los efectos que pueden tener no solo la ingesta crónica de alcohol, sino también las abstinencias repetidas entre periodos de consumo sobre el sistema endocannabinoide; es decir, lo que ocurre en una situación que se asemeje más al caso humano, donde aparece un consumo ininterrumpido durante determinados periodos alternándose con periodos de abstinencia (Obernier *et al.*, 2002b). Por otra parte, la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo sobre el receptor CB₁ y los niveles de

endocannabinoides, encontrándose pocos artículos en la literatura que analicen las posibles variaciones de la enzima FAAH tras varios periodos prolongados de consumo de alcohol o varios ciclos de abstinencia. Por estas razones, los objetivos concretos de este segundo diseño experimental han sido, en primer lugar, estudiar los posibles efectos de los dos tipos de patrones de administración (crónico ininterrumpido o consumo intermitente) de alcohol sobre los niveles de expresión del receptor CB₁ y la enzima FAAH; y, en segundo lugar, determinar si las variaciones inducidas por los tratamientos son específicas de cada área cerebral analizada.

Para ello, un grupo de animales fue expuesto al alcohol de forma crónica, y otro grupo de animales lo fue durante varios periodos de alcoholización y abstinencia. Una vez finalizados los periodos de alcoholización correspondientes a cada grupo, se extrajeron las muestras para realizar los análisis por PCR cuantitativa del receptor CB₁ y de la FAAH en áreas cerebrales implicadas en el circuito de recompensa, la actividad locomotora y el control de las emociones.

Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratas Wistar macho (280-290 g de peso), estabuladas en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Las condiciones ambientales del estabulario se mantuvieron constantes, con una temperatura de 20 ± 1 ° C, una humedad relativa de $50 \pm 1\%$ y un fotoperíodo invertido de 12 horas, comenzando la fase lumínica a las 20:00 horas. El acceso a la comida fue libre. Cada 5 días se pesó a los animales para evaluar las posibles ganancias/pérdidas de peso debidas al tratamiento, sin que se hayan observado diferencias en la evolución del peso corporal entre los distintos grupos experimentales. El alcohol fue administrado a los animales disuelto en el agua de bebida (8% v/v), según el procedimiento descrito por Uzbay *et al.* (2000) discutido en el diseño anterior. El periodo de exposición al alcohol fue de 25 días en el caso del grupo crónico. En el caso del grupo de abstinencia, los animales fueron expuestos a 5 ciclos de alcohol y abstinencia, mediante la alternancia de una solución con alcohol al 8% v/v (3 días) y agua (2 días). Los animales control fueron expuestos únicamente a agua. En la figura 14 se observa un esquema del protocolo seguido en este experimento.

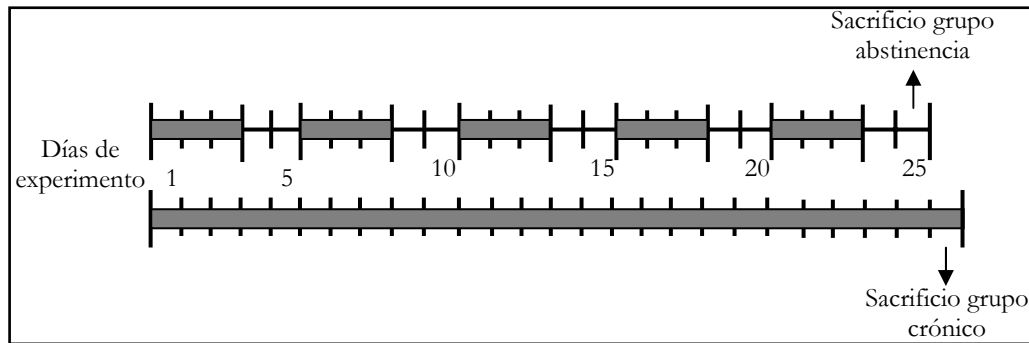


Figura 14. Esquema de los patrones de administración de alcohol en cada grupo experimental. Los animales pertenecientes al grupo de abstinencia fueron sometidos a 5 ciclos de alcoholización y abstinencia y sacrificados 24 horas después del inicio del último ciclo de abstinencia. El grupo crónico recibió alcohol durante 26 días consecutivos. El grupo control recibió únicamente agua durante todo el experimento.

Las muestras de los grupos control y crónico fueron tomadas el día 26 tras el inicio del experimento. En el caso del grupo de abstinencia fueron tomadas el día 25, 24 horas después del comienzo del último ciclo de abstinencia. Para la obtención de las muestras, se sacrificó a los animales por decapitación y se extrajeron los cerebros, que fueron congelados inmediatamente en isopentano y almacenados a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN. La disección de los tejidos se llevó a cabo en hielo; las áreas extraídas fueron el bulbo olfatorio, la amígdala y la corteza prefrontal.

DISEÑO EXPERIMENTAL #3: Evaluar el grado de afectación de ciertos elementos del sistema endocannabinoide en poblaciones de sujetos alcohólicos y no alcohólicos.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados en cuanto a las relaciones entre el sistema endocannabinoide y la adicción al alcohol se han llevado a cabo en animales de laboratorio, mientras que los datos que podrían ampliar el conocimiento de estas relaciones al caso de los humanos son todavía muy escasos. Sin embargo, éste es un punto crítico a la hora de establecer el potencial clínico que la manipulación del sistema endocannabinoide podría tener en el tratamiento del alcoholismo. Es por esta razón que, en esta tesis, también hemos querido trasladar algunos de los estudios realizados en animales de experimentación al ámbito de los pacientes alcohólicos, con las lógicas restricciones que existen en la investigación con muestras humanas. En concreto, nos propusimos evaluar el estado del sistema endocannabinoide en muestras de cerebros post mortem de pacientes alcohólicos, comparándolos con diversos tipos de controles. Para ello, en primer lugar evaluamos el estado

de los receptores CB₁ mediante ensayos de unión (*binding*), y en segundo lugar determinamos los niveles de FAAH, la principal enzima responsable de la degradación de los endocannabinoides.

Sujetos de estudio

En la tabla 9 se encuentra la descripción de las características de los sujetos de estudio en este análisis. Todos los sujetos alcohólicos tenían diagnóstico psiquiátrico previo (DSM IV o CIE) de abuso o dependencia de alcohol. Además, todos ellos presentaron en la autopsia lesiones anatomopatológicas hepáticas y/o cardíacas compatibles con historia previa de abuso de alcohol.

Tabla 9. Características demográficas de los sujetos de estudio. CTR, control; MN, muerte natural; S, suicidio; ALC, alcoholismo; ICRA, insuficiencia cardiorrespiratoria aguda; nd, no determinado; IPM, intervalo post mortem.

Grupo	Género	Edad	IPM (h)	Diagnóstico	Etiología Muerte	Mecanismo Muerte	Etanolemia (g/l)	Fármacos en plasma
CTR-MN	Mujer	66	15	Control	Accidente	Atropello	0	-
	Varón	71	19	Control	Natural	Insuficiencia cardíaca	0	Nordiazepam, Atropina
	Varón	48	7	Control	Accidente	Tráfico	0	-
	Varón	52	18	Control	Accidente	Laboral	0	Morfina, Midazolam, Metronidazol
	Varón	40	18	Control	Laboral	Laboral	0,56	-
	Mujer	36	9	Control	Natural	Cardiopatía isquémica	0	-
CTR-S	Mujer	58	48	Depresión	Suicidio	Sumersión	nd	nd
	Varón	65	19	T. obsesivo	Suicidio	Precipitación	0	Nordiazepam
	Varón	50	6	T. bipolar	Suicidio	Precipitación	0	Diazepam, Nordiazepam
	Varón	59	29	Depresión	Suicidio	Ahorcadura	0	Citalopram, Nordiazepam, Paracetamol
	Varón	44	15	T. ansiedad	Suicidio	Ahorcadura	0	-
	Mujer	48	9	T. ansiedad	Suicidio	Precipitación	0	Efedrina
ALC-MN	Mujer	51	8	Alcoholismo	Natural	ICRA	2,98	Nordiazepam
	Varón	68	15	Alcoholismo	Natural	Cirrosis	0	-
	Varón	50	24	Alcoholismo	Natural	ICRA	0	-
	Varón	57	12	Alcoholismo	Natural	ICRA	3,37	-
	Varón	43	4	Alcoholismo	Natural	ICRA	1,64	Clometiazol, Metamizol
	Mujer	43	35	Alcoholismo	Natural	Cirrosis	0	Metamizol, Fluoxetina
ALC-S	Mujer	57	24	Alcoholismo	Suicidio	Intoxicación	0,23	Alcohol metílico
	Varón	71	19	Alcoholismo	Suicidio	Ahorcadura	0,55	-
	Varón	50	3	Alcoholismo	Suicidio	Ahorcadura	0	-
	Varón	55	24	Alcoholismo	Suicidio	Intoxicación	2,4	-
	Varón	40	21	Alcoholismo	Suicidio	Atropello	0	-
						Tren		
	Mujer	50	6	Alcoholismo	Suicidio	Precipitación	0	Hidroclorotiazida

Dado que en algunos casos no se disponía de la historia clínica completa del sujeto, fue imposible determinar exactamente la duración del alcoholismo, pero en todos los casos fue superior a 5 años teniendo en cuenta las alteraciones orgánicas que presentaban. Por otra parte, la mayoría de ellos estaban o habían estado en tratamientos de deshabituación alcohólica aunque sin éxito (ver tabla 9).

Las regiones empleadas para la realización de este diseño experimental fueron la corteza cerebral, el caudado, el hipocampo y el cerebelo, que se recibieron ya diseccionadas del Banco de Tejidos de la Universidad del País Vasco.

DISEÑO EXPERIMENTAL #4: Evaluación del posible efecto beneficioso del antagonista CB₁ rimonabant sobre la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica temprana, y análisis de los mecanismos neuroquímicos implicados en este efecto.

El antagonista del receptor CB₁ rimonabant ha sido propuesto en numerosos estudios como posible agente terapéutico para el tratamiento de la dependencia al alcohol, puesto que es capaz de reducir la preferencia por el alcohol, su consumo y la recaída en varios modelos animales de alcoholismo. Sin embargo, hasta ahora nunca ha sido examinado por su capacidad para mejorar otras fases de esta adicción aparte de la fase de consumo. La publicación de resultados con ratones *knockout* para el receptor CB₁ en los que no aparecen signos del síndrome de abstinencia (Racz *et al.*, 2003) motivó el inicio de experimentos farmacológicos dirigidos a examinar la posible efectividad del rimonabant para reducir algunos signos del síndrome de abstinencia a alcohol como otro de los objetivos que se han estudiado en esta tesis doctoral. Los objetivos concretos que nos hemos planteado estudiar en este diseño experimental han sido, en primer lugar, desarrollar un modelo de abstinencia temprana al alcohol en el que se puedan evaluar determinados signos comportamentales propios de este estado, en particular la aparición de hiperactividad y sobretodo de ansiogénesis. Una vez establecida la aparición de signos del síndrome de abstinencia, quisimos valorar la capacidad del rimonabant para mejorar el estado de ansiedad incrementado que aparece en este modelo, y estudiar cuales podrían ser los mecanismos neuroquímicos implicados en la posible mejora experimentada tras la administración de rimonabant. Los posibles sustratos neuroquímicos a analizar han sido varios sistemas de neurotransmisión (GABAérgico, glutamatérgico, serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico) así como neuropéptidos [encefalina, neuropéptido Y y factor liberador de corticotropina (CRF)] implicados en la adicción al alcohol y otras drogas de abuso. Por último, tratamos de determinar la posible correlación

entre los efectos del rimonabant y el estado del sistema endocannabinoide en estas condiciones de abstinencia.

Como se detalla a continuación, para realizar este objetivo se realizaron experimentos con animales a los que se expuso al alcohol durante un periodo de 10 días, tras los cuales se interrumpió el consumo para inducir la abstinencia y se administró rimonabant de forma aguda. Se realizaron pruebas comportamentales 3 horas después del inicio de la abstinencia, tras las que se sacrificó a los animales y se extrajeron diversas áreas cerebrales implicadas en el estrés y la emoción, el control motor y la ingesta. En estas regiones se analizaron diferentes parámetros que podrían estar implicados en las respuestas comportamentales a la abstinencia al alcohol, para tratar de determinar los mecanismos neuroquímicos a través de los cuales el rimonabant podría resultar beneficioso en la mejora de la sintomatología de la abstinencia.

Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g de peso), estabuladas en jaulas individuales en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Las condiciones ambientales del estabulario se mantuvieron constantes, con una temperatura de 22 ± 1 ° C, una humedad relativa de $50 \pm 1\%$ y un fotoperíodo invertido de 12 horas, comenzando la fase lumínica a las 20:00 horas. Todos los experimentos se llevaron a cabo a las 3 horas desde el inicio de la fase oscura, ya que este periodo es el de máxima actividad de los animales. El acceso a la comida fue libre. Se realizaron dos series de experimentos, siempre bajo las normas de la Unión Europea para el cuidado animal (directiva 86/609/EEC).

Ingesta forzada de alcohol

Los animales fueron forzados a beber alcohol (7,2%) disuelto en el agua de bebida durante 10 días. La solución de alcohol se preparó a diario y se presentó a los animales siempre a la misma hora del día (10:00h). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a esta solución, mientras que el grupo control recibió únicamente agua durante el mismo periodo. Es importante decir que la diferencia en calorías consumidas por cada grupo experimental debido al tratamiento con alcohol no indujo modificaciones significativas en el peso de los animales durante el experimento (control: 54.4 ± 3.8 g, n=8, animales expuestos a alcohol: 52.8 ± 3.6 , n=8).

El día 10 tras el inicio del tratamiento se indujo la abstinencia de los animales expuestos al alcohol mediante el reemplazo de la botella de alcohol por otra con agua. La aparición de signos de abstinencia al alcohol fue evaluada a partir de las 3 horas tras la sustitución de la botella de alcohol por la de agua en una serie de experimentos preliminares

en los que se realizaron pruebas comportamentales en el actímetro y el laberinto en cruz elevado. Las respuestas comportamentales de abstinencia más acusadas aparecieron a las 3 horas desde el inicio de la abstinencia, y a partir de ahí comenzaron a ser menos evidentes, por lo que se eligió este tiempo de abstinencia para la realización de los experimentos de este diseño.

Tratamiento farmacológico

Se empleó SR141716 (Rimonabant) (N- piperidino- 5- (4- clorofenil)- 1- (2,4- diclorofenil)- 4- metilpirazol- 3- carboxamida, Sanofi–Aventis, Montpellier, Francia) como antagonista selectivo del receptor CB₁, y WIN55,212-2 (Tocris, Biogen, Madrid, España) como agonista cannabinoide no selectivo. Ambos compuestos fueron disueltos en Tween 80 (*polyoxyethylene sorbitan monooleate*, ICN Biomedicals) y suero salino y se administró intraperitonealmente (i.p.) 30 minutos antes de la prueba comportamental en el plus maze. El volumen de administración fue de 2 ml/kg.

En una primera serie de experimentos evaluamos los efectos de una única dosis de rimonabant sobre las modificaciones inducidas en el comportamiento y en la neuroquímica de los animales abstinentes al alcohol. Los animales abstinentes fueron separados en dos grupos, y 2,5 horas después de la interrupción del consumo de alcohol recibieron una inyección i.p. de rimonabant (0,5 mg/kg peso) o vehículo (Tween 80-salino). Esta dosis de rimonabant fue elegida por la experiencia en nuestro laboratorio con este compuesto, y a partir de los datos farmacológicos publicados previamente para este antagonista (ver revisiones en Barth y Rinaldi-Carmona, 1999; Muccioli y Lambert, 2005). Esta dosis baja fue elegida para tratar de encontrar un efecto ansiolítico que no estuviese asociado con el efecto hiperlocomotor ya descrito para este compuesto debido a sus propiedades como agonista inverso. Para analizar el estado de ansiedad de los animales (el parámetro más afectado en los experimentos pilotos realizados previamente), 30 minutos después de la inyección se realizó la prueba del laberinto en cruz elevado tanto a los animales tratados con rimonabant como a los controles. Otro grupo de animales fue inyectado con WIN55,212-2, a una dosis de (1 mg/kg peso). No se observaron efectos motores significativos en las ratas abstinentes tratadas con WIN55,212-2 (1 mg/kg peso). El objetivo de este experimento fue resaltar el efecto ansiolítico del rimonabant que aparece de forma exclusiva en la situación de ansiogénesis asociada a la abstinencia alcohólica, y que contrasta con los resultados descritos tanto para el rimonabant como para el WIN55, 212-2 en animales no tratados, puesto que se ha descrito que este agonista tiene un efecto ansiolítico en animales sin tratar (Haller *et al.*, 2004), para los que el

rimonabant resulta frecuentemente un compuesto ansiogénico (Navarro *et al.*, 1997; Arévalo *et al.*, 2001). Por último, intentando buscar una explicación a estos resultados farmacológicos, quisimos determinar el estado del sistema endocannabinoide en los animales abstinentes y en sus controles respectivos.

Obtención de muestras

Inmediatamente después de la prueba de comportamiento, los animales fueron rápidamente sacrificados por decapitación y sus cerebros extraídos y congelados en isopentano frío. Las muestras se conservaron a -80°C hasta que fueron procesadas para el análisis del contenido en neurotransmisores y de la expresión de ARNm de algunos marcadores moleculares relacionados con la adicción al alcohol como son la proencefalina, el neuropéptido Y (NPY) y el factor liberador de corticotropina (CRF).

En los experimentos diseñados para analizar el estado del sistema cannabinoide endógeno de los animales abstinentes y de sus controles, tras la extracción del cerebro se realizó la disección en frío del hipotálamo, la amígdala y el caudado-putamen, para medir en ellas el contenido de endocannabinoides. Las muestras fueron pesadas y almacenadas en tubos eppendorf que contenían metanol frío a -80°C hasta la extracción lipídica y el análisis. Como en el caso del diseño experimental #1, todo el procedimiento se realizó en menos de 10 minutos, para evitar la generación post mortem de 2-AG y AEA. En el caso del análisis de la densidad de los receptores CB₁ por ensayos de unión en secciones, los cerebros fueron extraídos y congelados inmediatamente en isopentano frío.

DISEÑO EXPERIMENTAL #5: Papel de los cannabinoides en un modelo *in vitro* de alcoholización crónica y abstinencia

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el consumo crónico de alcohol provoca múltiples modificaciones en muchos de los sistemas de neurotransmisión y neuromodulación. Algunos de estos cambios afectan de forma importante al sistema glutamatérgico, produciéndose un aumento de la actividad excitatoria a través de diversos mecanismos, como respuesta a la presencia inhibitoria del alcohol de forma prolongada. También el sistema GABAérgico se ve modificado de forma importante tras el consumo crónico de alcohol, de modo que si en estas condiciones se produce la retirada del alcohol, se pueden producir daños cerebrales como consecuencia de la hiperexcitabilidad neuronal resultante de las adaptaciones producidas en estos y otros sistemas de neurotransmisión durante la exposición crónica al alcohol.

En este diseño nos propusimos analizar, en primer lugar, el posible efecto neurotóxico de la administración crónica de alcohol y posterior abstinencia en un modelo *in vitro*, así como un posible incremento en la sensibilidad al daño excitotóxico en este modelo. En segundo lugar, quisimos estudiar el posible desarrollo de neuroadaptaciones en los sistemas cannabinoide, glutamatérgico y GABAérgico tras la administración crónica de alcohol en este modelo. En tercer lugar, quisimos evaluar, durante la situación de abstinencia alcohólica, por un lado, el papel de los agonistas cannabinoides, puesto que han sido descritos en múltiples ocasiones como moléculas neuroprotectoras; y por otro lado, las acciones del antagonista CB₁ SR141716, ya que se ha descrito que la delección genética del receptor CB₁ juega un importante papel en el desarrollo de las neuroadaptaciones que se producen durante el proceso de tolerancia al alcohol. Por último, tratamos de determinar los posibles efectos de estos cannabinoides sobre la expresión de las neuroadaptaciones producidas durante la alcoholización crónica.

Cultivos primarios puros de neuronas

Estos cultivos, que contienen menos del 5% de astrocitos, fueron preparados a partir de ratones Swiss entre los días de gestación 14-16, siguiendo el protocolo descrito por Rose et al. (1993). Tras la disección de la corteza cerebral y su disociación mecánica, se sembraron las células en placas previamente tratadas con poli-D-lisina y laminina. El medio utilizado fue DMEM (Sigma, Francia) suplementado con suero de caballo (5%), suero fetal bovino (5%) y glutamina 2mM. Tras 3 días *in vitro* (DIV) se interrumpió la división de células no neuronales añadiendo citosina- β -D-arabinofuranosida (Ara C) 10 μ M al medio de cultivo.

Protocolos de tratamiento con etanol

A partir del DIV 8 los cultivos fueron tratados con etanol 100 mM durante 3 (en la situación de abstinencia) o 5 días (en la situación de administración crónica de alcohol) consecutivos, siguiendo la metodología empleada previamente por Nagy *et al.* (2002). En el caso de la situación de abstinencia, en las siguientes 48 horas tras los 3 días de administración de alcohol no se añadió más alcohol al medio para provocar la abstinencia. Los compuestos cannabinoides fueron administrados a partir de soluciones madre disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO). Los tratamientos con cannabinoides fueron realizados a partir del DIV 8 hasta el final del experimento, o únicamente durante el periodo de abstinencia a alcohol, en función del objetivo del experimento en particular. En la figura 15 se detallan los protocolos de administración empleados.

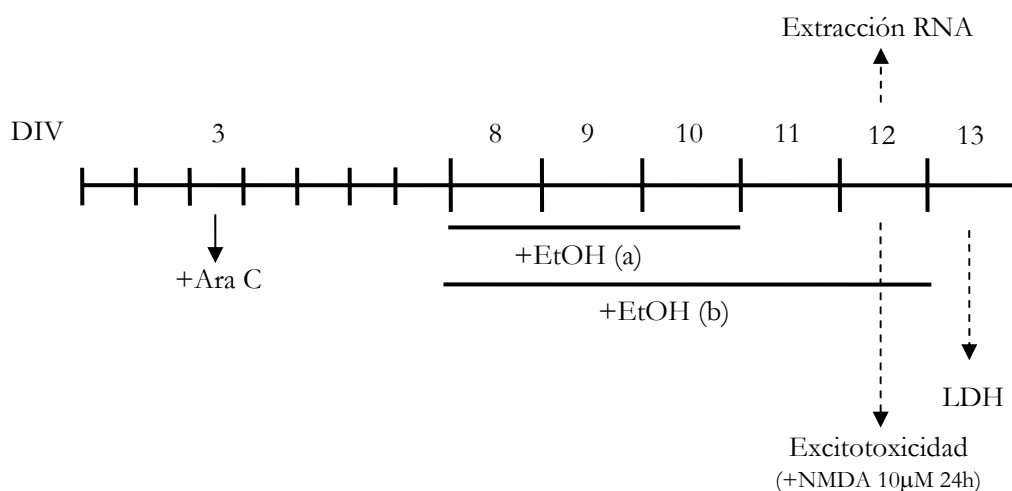


Figura 15. Descripción esquemática de los tratamientos realizados en los cultivos primarios de neuronas. El grupo de abstinencia (a) recibió alcohol durante 3 días consecutivos, tras los que no se volvió a añadir alcohol al medio para provocar la abstinencia. El grupo alcohol crónico recibió alcohol desde el DIV 8 hasta el final del experimento. La extracción de ARN y los experimentos de excitotoxicidad fueron realizados el DIV 12, a las 24 horas después del inicio de la abstinencia.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS COMPORTAMENTALES

2.1.1. Análisis de actividad locomotora general: actímetro

La actividad locomotora del animal fue analizada en un actímetro computerizado (Actitrack, Panlab, Barcelona, España). Este aparato consiste en un área cuadrangular de 45 x 45 cm con paredes de color negro mate, con luces infrarrojas situadas cada 2,5 cm a lo ancho de las paredes. Estas luces están acopladas a una unidad de control computerizada, que registra la actividad del animal en el interior. La prueba tiene una duración de 5 minutos, se desarrolló en condiciones de luz roja, y fue realizada por cada animal una única vez. Las variables que se midieron a lo largo de la prueba fueron las siguientes: (i) distancia recorrida en el actímetro (“ambulación”), velocidad media durante la prueba, e inactividad (“resting time”).

2.1.2. Pruebas de ansiedad: Laberinto en cruz elevado (*Elevated Plus-maze*)

En este aparato se valoran diversos parámetros comportamentales relacionados con la actividad locomotora y exploratoria, con la emotividad y con los niveles de ansiedad de los animales. Este análisis comportamental comprende un paradigma que implica un conflicto de aproximación-evitación para el animal (Pellow *et al.*, 1985; Pellow y File, 1986), y se trata de una de las más empleadas en la evaluación del estado de ansiedad de un animal. Resulta idónea para la identificación selectiva de drogas con efectos ansiolíticos o ansiogénicos, ya que existen evidencias fisiológicas y comportamentales que ponen de manifiesto que la tendencia de los

animales a evitar los brazos abiertos está motivada por el miedo y la ansiedad (Pellow *et al.*, 1985; Pellow y File, 1986; Cruz *et al.*, 1994) y es debida a la tendencia natural de los animales a la tigmotaxia (contacto físico con una pared o similar) y el miedo a los espacios abiertos y elevados. De esta forma, el laberinto en cruz elevado es una herramienta útil y ampliamente utilizada para la caracterización de la ansiedad inducida por la abstinencia al alcohol (Gatch *et al.*, 2000; Valdez y Koob, 2004).

El laberinto en cruz elevado está formado por dos brazos abiertos enfrentados, de 50 cm. de longitud y 10 cm. de ancho, y por dos brazos cerrados de las mismas dimensiones, perpendiculares a los primeros, también enfrentados, y con paredes de 40 cm. de altura. La confluencia de los cuatro brazos da lugar a un cuadrado central de 10 cm de lado. El aparato está construido en material plástico rígido de color negro mate y elevado 62 cm. del suelo por un soporte en forma de cruz. La duración de la prueba es de 5 minutos (De Cabo *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 1991) bajo condiciones de luz roja, y fue realizada por cada animal una única vez.

Al principio de la prueba se coloca al animal en la zona central del aparato. Esta zona es considerada la más neutra de todas, puesto que los brazos abiertos son los que más estrés generan al animal, y los brazos cerrados, por el contrario, son en los que el animal se siente más seguro y por tanto en los que tenderá a estar. Se considera que el animal está dentro de uno de los brazos cuando mantiene sus cuatro patas dentro del brazo, y se considera que sale de él en el momento en el que saca, al menos, una de las patas (Pellow *et al.*, 1985).

Los parámetros contabilizados en esta prueba han sido:

- *Número de entradas a los brazos abiertos*: número de veces que el animal entra en cualquiera de los dos brazos abiertos.
- *Tiempo en brazos abiertos*: tiempo en segundos que el animal permanece en los brazos abiertos.
- *Número de entradas a los brazos cerrados*: número de veces que el animal entra en alguno de los dos brazos cerrados.
- *Tiempo en los brazos cerrados*: tiempo en segundos que el animal permanece en los brazos cerrados.

El tiempo permanencia y el número de entradas a los brazos abiertos son inversamente proporcionales al estado de ansiedad del animal, es decir, a mayores valores de tiempo de permanencia o de número de entradas en los brazos abiertos, menores niveles de

ansiedad presenta el animal, siempre teniendo en cuenta el estado locomotor general del animal, gracias a la estimación del número de entradas a brazos cerrados.

2.2. VALORACIÓN DE NEUROTRANSMISORES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA (HPLC-ED)

2.2.1. Obtención y preparación de las muestras

Inmediatamente después de sacrificar cada animal por decapitación, se extrajo el cerebro y se congeló por inmersión durante unos segundos en un vaso de isopentano sumergido en nieve carbónica. Los cerebros se almacenaron en un congelador a -80°C hasta el momento del análisis por HPLC. El día del análisis de las muestras, de cada cerebro se realizaron manualmente secciones de unas 500 µm, siguiendo un procedimiento que ya ha sido publicado por nuestro laboratorio (Sagredo *et al.*, 2006). Sobre las correspondientes secciones realizadas, se diseccionaron y se extrajeron las distintas áreas de análisis, siguiendo las coordenadas del atlas publicado por Paxinos y Watson (1997). Las áreas elegidas fueron: corteza prefrontal, caudado-putamen, globo pálido, sustancia nigra, núcleo accumbens, área tegmental ventral, amígdala e hipotálamo. Una vez diseccionadas, las muestras fueron homogeneizadas en 20-40 volúmenes de tampón fosfato potásico 150 mM frío (pH = 6,8), y cada homogeneizado se utilizó para el análisis de: (i) GABA y glutamato, (ii) noradrenalina y dopamina, y (iii) serotonina. Una alícuota de cada homogeneizado se utilizó además para medir el contenido en proteína según el método descrito por Lowry *et al.* (1951).

2.2.2. Determinación de los contenidos de GABA y glutamato

Los niveles de GABA y glutamato fueron analizados por HPLC con detección electroquímica siguiendo la metodología empleada por Smith y Sharp (1994). Los homogeneizados fueron diluidos con ácido perclórico 0,4N conteniendo bisulfito sódico 0,4 mM, EDTA 0,90 mM y 5 µg/ml β-aminobutyrate (BABA) como estándar interno. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 3 minutos a 15000 g y, del volumen total de sobrenadante, se tomaron 50 µl que fueron neutralizados con 100 µl de hidróxido sódico 0,1 N. Las muestras fueron así almacenadas a 4°C hasta el momento del análisis.

El análisis de GABA y glutamato incluye la detección electroquímica requiere una reacción química previa denominada derivatización, debido a que ambas son moléculas no electroactivas, es decir, no son fácilmente oxidables. En concreto hemos utilizado la derivatización por el método OPA-sulfito, en el que se añaden 15 µl de *o*-ftaldehído

(OPA)-sulfito (OPA 14,9 mM, sulfito sódico 45,5 mM y etanol 4,5 % en tampón borato 327 mM, pH = 10,4) y permitiendo reaccionar a las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez realizada la derivatización, se inyectaron 20 µl de cada mezcla de reacción en el sistema de HPLC. Además de las muestras, se inyectaron también estándares de calibración derivatizados compuestos por glutamato, GABA y BABA a concentraciones conocidas.

El sistema de HPLC empleado para el análisis de GABA y glutamato consistió en una bomba Spectra-Physics 8810; la columna utilizada fue una RP-18 (Tracer Excel 120 ODSB; 150 mm, 4.6 mm, 5 µm particle size; Teknokroma, Barcelona, España). La fase móvil, previamente desgasificada y filtrada, estaba formada por dihidrógeno fosfato de sodio 0,6 M, EDTA 0,06 mM y metanol (30% en el caso del análisis de GABA y 5% en el caso del glutamato), pH=4,4, a un flujo de 0,8 ml/min. La detección se llevó a cabo con un detector bioanalítico amperométrico Metrohm, utilizando un electrodo de fibra de carbono con un potencial relativo de 0,85 V relativo a un electrodo de referencia de Ag/AgCl con una sensibilidad de 50 nA (aproximadamente 2 ng por muestra). La señal fue registrada en un integrador Spectra-Physics 4290 y los resultados obtenidos de los picos fueron calculados por comparación con el área bajo la curva del pico correspondiente al estándar interno. Los valores se expresan en µg/mg proteína.

2.2.3. Determinación de los contenidos de noradrenalina y dopamina

Los niveles de dopamina y noradrenalina fueron analizados por HPLC con detección electroquímica, según la metodología previamente publicada por nuestro grupo (González *et al.*, 1999). Los homogeneizados fueron diluidos en ácido perclórico 0,4 N frío que contenía bisulfito sódico 0,4 mM, EDTA 0,90 mM, y dihidroxibenizilamina (DHBA) 25 ng/mg como estándar interno. Los homogeneizados diluidos fueron centrifugados y los sobrenadantes se inyectaron en el sistema de HPLC como en el caso anterior. La fase móvil estaba compuesta por ácido cítrico 100 mM, acetato sódico 100 mM, sulfonato de heptano 1.2 mM, EDTA 1 mM y metanol 7% (pH = 3.9). El flujo utilizado fue de 0.8 ml/min. La detección se realizó con un detector electroquímico (Coulochem II, ESA) utilizando un sistema de oxidación/reducción (célula acondicionadora: +360 mV; célula analítica #1: +50 mV; célula analítica #2: -340 mV). La señal se registró en un integrador Spectra-Physics 4290 desde la célula analítica #2, con una sensibilidad de 50 nA (10 pg por muestra). Los resultados fueron obtenidos a partir de los picos y calculados mediante la comparación con el área bajo la curva del pico correspondiente al estándar interno. Todos los valores fueron expresados en ng/mg proteína.

2.2.4. Determinación de los contenidos de serotonina

El contenido en serotonina fue analizado por HPLC con detección electroquímica según publicaciones previas de nuestro grupo (Sagredo *et al.*, 2006). Los homogeneizados fueron diluidos en ácido perclórico frío conteniendo bisulfito sódico 0,4 mM, EDTA 0,90 mM y *N*-metil-serotonina (200 ng/ml) como estándar interno. Los homogeneizados diluidos fueron centrifugados y los sobrenadantes inyectados en el sistema de HPLC indicado previamente. La fase móvil empleada estaba formada por ácido cítrico 100 mM, acetato sódico 100 mM, EDTA 1mM y metanol 7%; pH=4,2. El flujo fue de 0,8 ml/min. La detección se llevó a cabo con un detector bioanalítico amperométrico Metrohm, utilizando un electrodo de fibra de carbono con un potencial relativo de 0,85 V relativo a un electrodo de referencia de Ag/AgCl con una sensibilidad de 50 nA (aproximadamente 2 ng por muestra). La señal fue registrada en un integrador Spectra-Physics 4290 y los resultados obtenidos de los picos fueron calculados por comparación con el área bajo la curva del pico correspondiente al estándar interno. Los valores se expresan en ng/mg proteína.

2.3. MEDIDA DE ENDOCANNABINOIDES POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.3.1. Extracción lipídica

Todas las muestras correspondientes a la misma región cerebral fueron procesadas en el mismo día. Se añadió un mínimo de 20 volúmenes de metanol a cada muestra, y anandamida deuterada (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) como estándar interno para medir la recuperación de los compuestos a analizar por cada muestra. Las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 15000 rpm durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos de polipropileno de 15 o 50 ml, añadiéndose agua a cada muestra para crear una solución agua-metanol a una proporción 75:25. Posteriormente se extrajeron los compuestos a analizar a través de columnas de extracción de fase sólida (C18) (500 mg; Varian, Harbor City, CA, USA). Para la extracción en columnas se realizó previamente el acondicionamiento de la columna con 2,5 ml de metanol puro, después 1,5 ml de agua, y por último se cargó la muestra en la columna. Posteriormente se realizaron dos lavados: primero con agua (1,5 ml) y después con metanol 85% (1,5 ml). En el caso de las muestras de corteza prefrontal, cuyo peso era mayor que el resto de muestras, se realizaron tres lavados tras cargar la muestra en la columna: primero con agua (1,5 ml), después con metanol 60% (1,5 ml) y por último metanol 85% (1,5 ml). Finalmente se realizó la extracción

de los compuestos a analizar con metanol puro (1,5 ml). Antes del análisis en el espectrómetro de masas, cada muestra fue agitada vigorosamente para homogeneizar bien el contenido lipídico. Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo y todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC/espectrometría de masas.

2.3.2. Análisis y cuantificación de las muestras

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). En primer lugar, se separó por cromatografía líquida el contenido de las muestras, mediante la inyección de 10 µl de muestra en un inyector automático (Agilent 1100 series autosampler, Wilmington, DE) y su paso a través de columnas Zorbax eclipse XDB 2.1X 50-mm C18 de fase reversa. El gradiente de elución (200 µl/min) se consiguió utilizando dos bombas Shimadzu 10AdVP (Columbia, MD). El análisis espectrofotométrico de masas se realizó con un espectrómetro de masas acoplado a un detector selectivo de masas de triple cuadrupolo de Applied Biosystems/MDS Sciex (Foster City, CA) API 3000, utilizando ionización por electrospray. Los niveles de cada compuesto fueron analizados mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM) en el sistema de cromatografía. Para poder cuantificar el contenido de cada compuesto en la muestra se inyectaron estándares sintéticos entre muestras. Los pesos moleculares de cada molécula y de sus fragmentos iónicos se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. Pesos moleculares y correspondientes fragmentos iónicos utilizados en la cuantificación de las moléculas analizadas por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC/MS/MS).

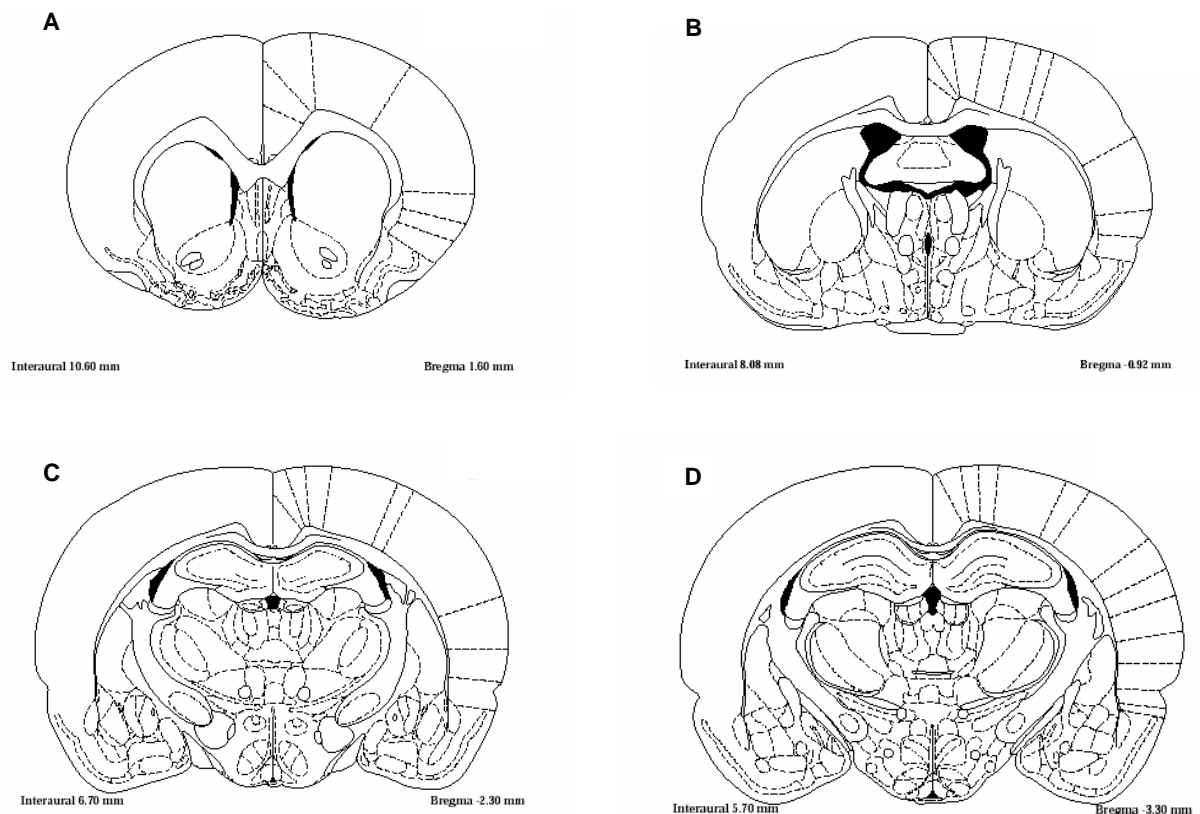
Compuesto	Peso molecular	Fragmento iónico
2-AG	379.3	287.3
AEA	348.3	62.5
PEA	300.3	62.5
LEA	324.3	62.5
OEA	326.3	62.5
SEA	328.3	62.5

2.4. ANÁLISIS DE UNIÓN ESPECÍFICA AL RECEPTOR CB₁ MEDIANTE AUTORRADIOGRAFÍA

2.4.1. Preparación de secciones

Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 20 µm de ancho en un criostato, siguiendo el atlas de Paxinos y Watson (1986). Las secciones correspondientes a las láminas #16, #23, #29 y #38 (ver figura 16) fueron montadas en portas previamente gelatinizados, secadas brevemente al aire y almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis. Para la identificación de los diferentes núcleos cerebrales, secciones adyacentes a aquellas de interés para el experimento fueron teñidas con violeta de cresilo e identificadas según el atlas de Paxinos y Watson (1986).

Figura 16. Láminas del atlas de Paxinos indicando la posición de los cortes para la disección de las áreas del cerebro seleccionadas para el estudio de la neuroquímica. A: nivel del que se extraen la corteza, el caudado-putamen y el núcleo accumbens; B: nivel en el que se extrae el globo pálido; C: nivel en el que se encuentra la amígdala; D: nivel del que se extraen el área tegmental ventral y la sustancia nigra.



2.4.2. Autorradiografía del receptor CB₁

La densidad del receptor CB₁ se determinó siguiendo el método descrito por Herkenham *et al.* (1991). Para determinar las uniones total e inespecífica, las secciones de cerebro fueron incubadas en tampón Tris 50 mM con un 5% de albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos y [³H]-CP-55,940 10 nM (Du Pont NEN) (pH = 7,4), preparado en presencia o en ausencia de CP-55,940 10 μM no marcado (Tocris, Biogen, Madrid, España) durante 2,5 horas a 37°C. Posteriormente las secciones fueron lavadas con tampón Tris 50 mM con BSA al 1% (pH = 7.4) durante 4 horas (2 lavados de 2 horas) a 0°C. Por último se lavaron las secciones en agua destilada fría, y secadas al aire. Los autorradiogramas se obtuvieron exponiendo el tejido marcado, junto con estándares autorradiográficos ([³H] micro-scales, Amersham), a películas sensibles a tritio ([³H]-Hyperfilm, Amersham) durante 10 días. Las películas se revelaron durante 4 minutos a 20°C y posteriormente fueron analizadas y cuantificadas en un densitómetro utilizando la curva de estándares generada a partir de los estándares de tritio incluidos en la exposición.

2.5. ANÁLISIS DE UNIÓN ESPECÍFICA AL RECEPTOR CB₁ EN FRACCIÓN DE MEMBRANA

2.5.1. Preparación de las membranas

Para obtener fracciones de membrana a partir de las muestras de diversas áreas cerebrales, se homogeneizó el tejido durante 20 sg con un Polytron a velocidad 2-3 en 20 volúmenes de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) con phenyl-methyl-sulfoxide (PMSF) 1 mM y iodoacetamida 0,5 mM para inhibir las proteasas. El homogeneizado se centrifugó primero a 1100 g a 4°C durante 10 min. Tras esta centrifugación se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 40000 g, a 4°C, 10 min. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió y se volvió a homogeneizar el pellet en 3 ml de Tris-HCl 20 mM. Por último, se volvió a centrifugar (40000 g, 10 min, 4°C) y se recuperaron los pellets, que se congelaron a -80°C hasta el día del ensayo de binding. El volumen final de resuspensión de las membranas para el ensayo varía en función de la concentración deseada de proteína; en este caso se han utilizado concentraciones entre 2-4 mg/ml. La determinación de la concentración de proteína se realizó utilizando el kit RC-DC Protein Assay (Biorad, Madrid, España).

2.5.2. Ensayos de binding de [3 H]-WIN55,212-2

El análisis de los sitios de unión a cannabinoides se realizó mediante el método descrito por Houston *et al.* (1991) con ligeras modificaciones que ya han sido publicadas previamente (Romero *et al.*, 1995). Los ensayos se realizaron en placas (Deep/Well Proplate-96U, Perkin-Elmer, Boston, MA) previamente siliconizadas con Sigmacote (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). El ligando radioactivo utilizado fue [3 H]-WIN55,212-2 (actividad específica 40.0-52.2 Ci/mmol) (Perkin-Elmer, Boston, MA), en un rango de concentraciones entre 1 y 32 nM (6 concentraciones diferentes). Para desplazar al [3 H]-WIN55,212-2 se utilizó WIN55,212-2 a una concentración 5 μ M. Tanto el ligando radioactivo como el frío se diluyeron a partir de soluciones madre hasta las concentraciones deseadas en tampón compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) con EDTA 2,5 mM, MgCl₂ 5 mM y albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos (0,5 mg/ml). Las fracciones de membrana fueron también diluidas en el tampón de incubación hasta obtener una concentración final de proteína de 0,2-0,4 mg/ml. El volumen final de incubación fue de 0,5 ml. Se incubaron las membranas durante 90 min a 30°C, tras los que se realizó la filtración a través de filtros (Printed Filtermat A 1450-421; Perkin-Elmer, Boston, MA) pre-equilibrados en polietilenimina 0,05%. Se lavaron los filtros 9 veces con el mismo tampón a 4°C. Se secaron las placas y se aplicó líquido de centelleo (Meltilex A Melt-On Scintillator, Perkin-Elmer, Boston, MA). La radioactividad unida a las membranas se determinó en un contador MicroBeta TriLux (Perkin-Elmer, Boston, MA). La unión específica de [3 H]-WIN55,212-2 se calculó como la diferencia entre la unión en presencia o ausencia de WIN55,212-2. En la figura 17 se puede observar el perfil de una curva “tipo” del binding de [3 H]-WIN55,212-2 en suspensión de membranas.

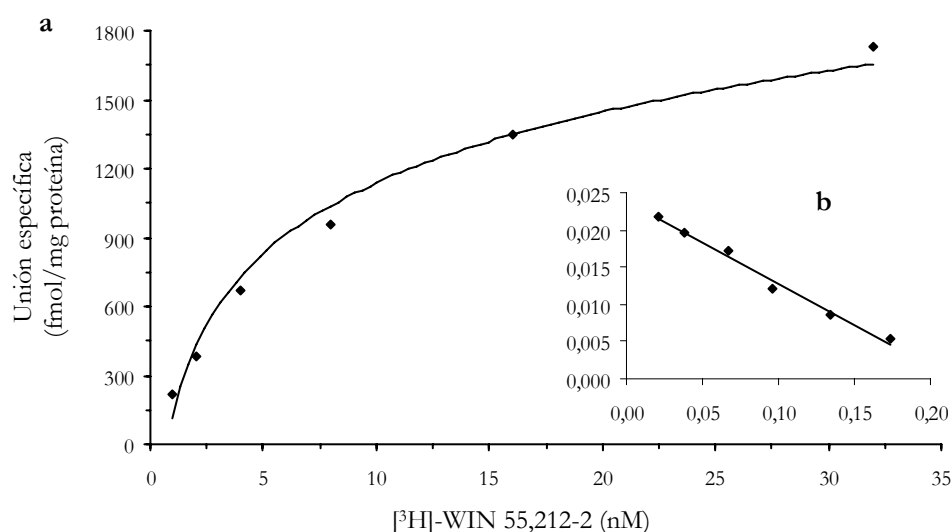


Figura 17. Curva de saturación (a) y transformación de Scatchard (b) de la unión de [3 H]-WIN55,212-2 (1-32 nM) en membranas obtenidas de la corteza de un sujeto perteneciente al grupo alcoholismo-suicidio.

2.6. CUANTIFICACIÓN DE ARNm MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU*

2.6.1. Preparación de secciones

Las secciones fueron preparadas como se ha descrito previamente para el ensayo de unión específica al receptor CB₁ mediante autorradiografía (apartado 2.4.1).

2.6.2. Análisis de los niveles de ARNm de proencefalina, neuropéptido Y (NPY) y factor liberador de corticotropina (CRF)

Marcaje de los oligonucleótidos

El marcaje de estos oligonucleótidos se llevó a cabo mediante una reacción de incorporación de [α^{35} S]dATP (1000 Ci/mmol; Amersham Ibérica, Madrid, España) a su extremo 3' catalizado por la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal recombinante (rTdT) (Boehringer Mannheim, Barcelona, España). Para purificar los oligonucleótidos se pasan por una columna de purificación (Mini Quick Spin Columns, Roche) y posteriormente se cuantifica la actividad específica (cpm/ μ l) de las sondas marcadas. Para ello, se utilizó una alícuota de 1 μ l de sonda y 4 ml de líquido de centelleo (Scharlau, Madrid) y se midió el marcaje en un contador de isótopos β . El resto de la sonda marcada se almacenó a -20°C hasta la hibridación. Las secuencias de las sondas empleadas para estos análisis se especifican en la tabla 11.

Tabla 11. Secuencias de nucleótidos de las diferentes sondas utilizadas en las hibridaciones *in situ*. (AE, actividad específica de la sonda en el ensayo).

Sonda	Referencia	Secuencia de Nucleótidos	Exposición (días)	AE (cpm/ μ l)
Proencefalina (PENK)	Young <i>et al.</i> , 1986	Kit comercial NEN-Du Pont, Itisa, Madrid, España	3-7 días	3333,3
NPY	Suzuki <i>et al.</i> , 2004	5'-GAG TAG TAT CTG GCC ATG TCC TCT GCT G-3'	14 días	3333,3
CRF	Gabriel <i>et al.</i> , 2005	5'-CAG TTT CCT GTT GCT GTG AGC TTG CTG AGC TAA CTG CTC TGC CCT GGC-3'	7 días	3333,3

Prehibridación

Antes de someter el tejido a la hibridación con la sonda se sometió a un tratamiento de prehibridación que contribuye a incrementar la sensibilidad del ensayo, mantener la morfología celular y reducir la unión electrostática de la sonda al tejido, bloqueando los grupos amino de las proteínas y disminuyendo, de esta manera, el nivel de fondo en la hibridación del tejido. El tratamiento de prehibridación consiste en:

- 1- Fijación del tejido mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en solución de salino tamponado con fosfato salino(PBS)
- 2- Acetilación del tejido mediante inmersión en una solución de anhídrido acético al 0,25%
- 3- Deshidratación mediante inmersión en solución de etanol a concentraciones crecientes (lavados de 2 minutos en etanol al 70%, 80%, 95% y 100%)
- 4- Deslipidificación de los tejidos mediante inmersión en cloroformo durante 10 minutos.
- 5- Rehidratación de los tejidos pasándolos de nuevo por etanol.

Hibridación con la sonda y determinación de mRNA de diferentes genes.

Después del pretratamiento, las secciones se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a la reacción de hibridación con la sonda previamente marcada, la cual se descongeló y se añadió al tampón de hibridación. Este tampón está formado por:: formamida 50%, SSC 4x, ADN de esperma de salmón desnaturalizado (500 µg/ml), ARN transferente (250 µg/ml), solución Denhardt's 1x, sulfato de dextrano 10%, ditiotreitól (DTI) 10 mM. La mezcla se aplicó sobre el tejido (25 µl/sección), las secciones se colocaron en un recipiente humidificado y se incubaron a 43°C durante toda la noche. Esta temperatura está seleccionada para obtener todos los híbridos específicos y eliminar los no específicos a lo largo de los posteriores lavados. La concentración de la sonda utilizada en los experimentos es de 104 cpm/µl o 1/3x104 cpm/µl, concentración que, según hemos comprobado, rinde un nivel óptimo de sensibilidad en el marcaje y produce un nivel mínimo de fondo inespecífico. Tras la incubación y para eliminar el exceso de sonda, se lavaron los portas en SSC 1X (cloruro sódico 0,15M/citrato sódico 0,015 M, pH=7,0) a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió 4 veces, cambiando la solución de SSC 1X cada vez. Posteriormente las secciones se aclararon en H₂O bidestilada y se secaron al aire. Para la exposición del tejido, los portas, completamente secos, se colocaron en casetes de autorradiografía y se enfrentaron a una película autorradiográfica (Kodak BIOMAX™ MR, Amersham, Madrid). Las películas se analizaron en un analizador de imagen (Molecular Dynamics, Image Quant 3.2). Para determinar la especificidad de la señal, secciones cerebrales adyacentes a las del análisis se incubaron con exceso de sonda fría o en presencia de otra sonda no marcada y no relacionada con la que se analiza en cada caso. Las medidas fueron agrupadas a partir de dos secciones cerebrales del mismo animal, y como mínimo 5 animales fueron analizados en cada grupo experimental.

2.7. CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES Y MUERTE NEURONAL INDUCIDA POR EXCITOTOXICIDAD

2.7.1. Cultivos primarios puros de neuronas

Estos cultivos, que contienen menos del 5% de astrocitos, fueron preparados a partir de ratones Swiss entre los días de gestación 14-16, siguiendo el protocolo descrito por Rose *et al.* (1993). Tras la disección de la corteza cerebral y su disociación mecánica, se sembraron las células en placas previamente tratadas con poli-D-lisina y laminina. El medio utilizado fue DMEM (Sigma, France) suplementado con suero de caballo (5%), suero fetal bovino (5%) y glutamina 2mM. Tras 3 días *in vitro* (DIV) se interrumpió la división de células no neuronales añadiendo citosina- β -D-arabinofuranosida (Ara C) 10 μ M al medio de cultivo.

2.7.2. Muerte neuronal inducida por excitotoxicidad

La excitotoxicidad fue inducida mediante la administración al cultivo de NMDA 10 μ M en medio de cultivo suplementado con glicina 10 μ M durante 24 horas a 37°C (Choi, 1992). La muerte neuronal se estimó en primer lugar por la observación del cultivo en un microscopio de contraste de fases, y se cuantificó mediante la medida de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo por parte de las células dañadas por la presencia del NMDA 24h después de su adición (Koh y Choi, 1987). El nivel de LDH correspondiente a la muerte neuronal total (100%) (sin muerte glial) se determinó en pocillos de la misma placa mediante la adición de NMDA 100 μ M durante 24h. El nivel de LDH de fondo fue determinado también en pocillos de la misma placa sujetos a los mismos lavados, y sustraídos de los valores experimentales para obtener la medida específica del daño inducido experimentalmente. En la figura 18 se puede observar la evolución del proceso excitotóxico que se observa en estos cultivos bajo este protocolo experimental.

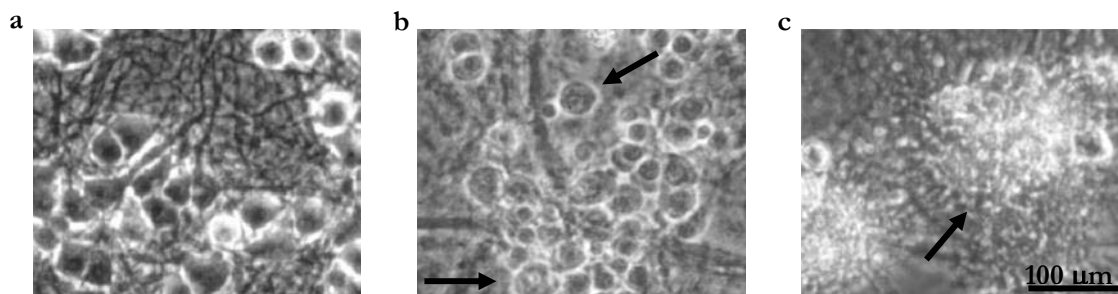


Figura 18. Imágenes de la evolución de un experimento de excitotoxicidad en cultivos primarios de neuronas. **a**, cultivo en el que se observan neuronas maduras (DIV 12); **b**, tras 6h de la adición de NMDA 10 μ M se empieza a observar la hinchazón de los somas celulares (edema citotóxico) ligada a la entrada masiva de calcio, sodio y agua en el citosol, y que está iniciada por la sobreactivación de los receptores NMDA. **c**, la célula pierde su integridad funcional y física debido a procesos de necrosis.

2.8. ANÁLISIS MEDIANTE *WESTERN-BLOT*

Las regiones cerebrales analizadas fueron homogeneizadas a 4°C en tampón RIPA (1% PBS, 1% IGEPAL, 0.5% ácido deoxicolato sódico, 0.1% SDS y PMSF 1mM) y posteriormente centrifugadas a 40000g durante 30 min a 4°C. La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit RC-DC Protein Assay (Bio-Rad, Madrid, España) utilizando albúmina de suero bovino como proteína estándar para construir la curva patrón. Las muestras se diluyeron con tampón de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 10%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol al 87% y β -mercaptoetanol) y se calentaron a 90°C durante 5 minutos. Junto a las muestras también se desnaturaliza un patrón con pesos moleculares conocidos, Precision Plus Protein™ Standars (Biorad, Madrid, España). Por cada muestra se cargaron 40 μ g de proteína, que fueron sometidas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. La electroforesis se realizó a 25 mA/gel a 4°C. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Amersham, Madrid, España) en tampón de transferencia compuesto por Tris/glicina/metanol a 4°C bajo un voltaje constante de 350mA durante 45 min. Para evitar uniones inespecíficas, las membranas resultantes se bloquearon posteriormente en solución bloqueante (TBS-Tween 20 y 5% de leche desnatada en polvo) durante 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-FAAH procedente de conejo (1:500) (Alexis Biochemicals, Lausen, Suiza) durante 2 horas a temperatura ambiente; después con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina procedente de ratón (1:20000) (Sigma Chem., Madrid, España) durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron incubadas con anticuerpos monoclonales anti-IgG de conejo (1:2500) y de ratón (1:5000) (ECL_{TM} Western Blotting Analysis System, RPN 2108; Amersham Biosciences, Barcelona, España) durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron en solución de bloqueo. Los inmunoblots fueron revelados por quimioluminiscencia con el kit ECL_{TM} Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences, Barcelona, España) y posteriormente densitometrados con un densitómetro calibrado GS-800 (Biorad, Madrid, España). En el caso del análisis del receptor CB₁ por *western-blot* se empleó un protocolo similar que para el análisis de FAAH, utilizando un anticuerpo policlonal anti-CB₁ (1:500; Affinity Bioreagents, Goleen, CO, USA).

Se realizaron controles para determinar la especificidad de los anticuerpos empleados en membranas incubadas con o sin anticuerpo primario anti-CB₁ (figura 19) o anti-FAAH (figura 20) y con o sin los anticuerpos secundarios correspondientes.

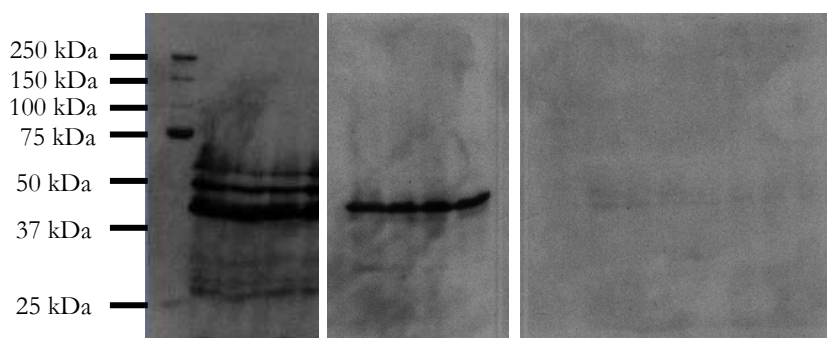


Figura 19: prueba de especificidad del anticuerpo anti-CB₁ en las muestras analizadas. Derecha, anticuerpos primarios anti-CB₁ y anti- β -actina, incubados posteriormente con sus secundarios correspondientes (ver texto). Centro, membrana incubada únicamente con anticuerpo anti- β -actina y su anticuerpo secundario, donde se puede observar la desaparición de la banda correspondiente a CB₁. Izquierda, membrana incubada únicamente con los anticuerpos secundarios donde apenas aparecen bandas inespecíficas.

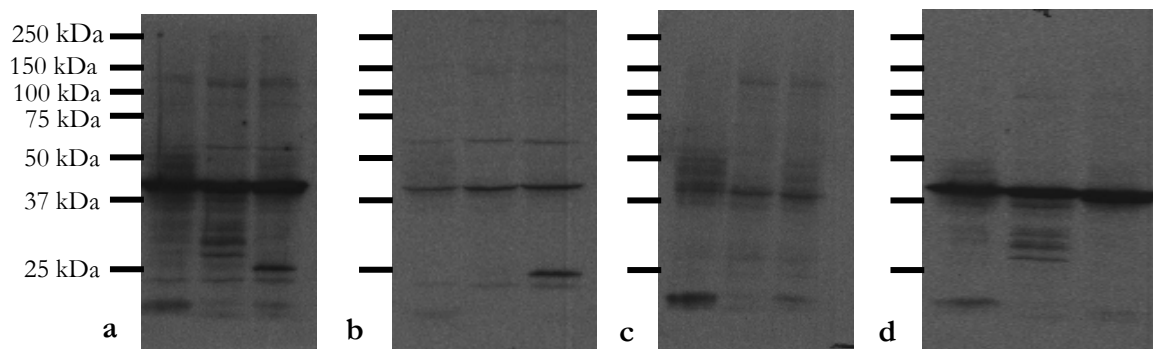


Figura 20: prueba de especificidad del anticuerpo anti-FAAH en las muestras analizadas. **a**, anticuerpos primarios anti-FAAH y anti- β -actina, incubados posteriormente con sus secundarios correspondientes (ver texto). **b**, membrana incubada únicamente con anticuerpo anti-FAAH y su anticuerpo secundario; **c**, membrana incubada únicamente con los anticuerpos secundarios donde aparecen algunas bandas inespecíficas debidas únicamente a la presencia de los dos anticuerpos secundarios; **d**, membrana incubada únicamente con anticuerpo anti- β -actina y su anticuerpo secundario, donde se puede observar la desaparición de la banda correspondiente a FAAH.

2.9. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm POR RT-PCR cuantitativa (qPCR)

Extracción de ARN, transcripción reversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa (qPCR)

En el caso del diseño experimental #2, el ARN total de las diversas áreas cerebrales analizadas en este estudio fue extraído con la ayuda del kit comercial RNeasy mini columns

(Qiagen, UK). El DNA genómico contaminante fue degradado mediante el tratamiento de las muestras con DnaseI (Qiagen, UK). La cantidad de ARN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop technologies, USA). Posteriormente se realizó la transcripción inversa de 1 µg del ARN total en DNA complementario (cDNA) mediante el kit Promega reverse transcription (Promega, España). Por último, una alícuota de 1 µl de cDNA se amplificó por qPCR utilizando el kit Universal Taqman Mastermix. Los primers del gen de referencia, GAPDH, y de los genes de estudio fueron diseñados por Applied Biosystems (UK) y obtenidos de esta misma casa comercial. Cada muestra fue analizada por duplicado, y en paralelo se realizó una curva patrón con 6 puntos. En cada qPCR se incluyó un control sin transcripción inversa para eliminar la posibilidad de amplificación de DNA genómico o de ARN. La cuantificación relativa se obtuvo mediante el cálculo del ratio entre los valores obtenidos para cada gen de interés y el gen de referencia GAPDH. Los resultados se expresaron como el porcentaje frente al control en cada condición y área.

En el caso del diseño experimental #5, la extracción y purificación del ARN total de los cultivos primarios de neuronas se efectuó con la ayuda del kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La cantidad de ARN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop technologies, USA). Posteriormente se realizó la transcripción inversa de 0,5 o 1 µg (en función de la cantidad inicial disponible) de ARN total en cDNA mediante el kit iScript™ Select cDNA Synthese Kit (Bio-Rad, CA, U.S.A.). Por último, una alícuota de cDNA se amplificó por qPCR utilizando el kit IQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, CA, U.S.A.). Los primers “forward” (F) y “reverse” (R) para los genes estudiados fueron diseñados con la ayuda del programa ABI PRISM Primer Express® 2.0, y validados según criterios de especificidad, eficacia y cuantitatividad. Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la tabla 12. Cada muestra fue analizada por triplicado, y en cada qPCR se incluyó un control exclusivamente con agua y otro sin transcripción inversa para eliminar la posibilidad de contaminación y amplificación de DNA genómico o de ARN. Como en el caso anterior, los resultados se expresaron como el porcentaje frente al control en cada condición y área.

Tabla 12. Secuencias de los primers *forward* y *reverse* diseñados y utilizados para los análisis por PCR cuantitativa en el diseño experimental #5.

	Oligo <i>forward</i>	Oligo <i>reverse</i>
NR1	CTCTAGCCAGGTCTACGCTATCC	GACGGGGATTCTGTAGAAGCCA
NMDA NR2A	ACATCCACGTTCTTCCAGTTTGG	GACATGCCAGTCATAGTCCTGC
NR2B	CCAGAGTGAGAGATGGGATTGC	TGGGCTCAGGGATGAACTGT
$\alpha 1$	CCTATCTGCTTTACTGCCTCTGTC	GCTGAATACTCTGCTCTGCTCTG
GABAA $\alpha 4$	ACAGGTCACATAACACAGTTTGCC	ACAGAATCTTGCGAGGACATTAGC
$\beta 3$	ATGGTGTTGACGCCTTGATGAC	GGGACTGATAGAGAAGGGCTACTG
CB ₁	GTGTGCTGTTGCTGTTTCATTGTG	CCTTGCCATCTTCTGAGGTGTG
FAAH	ATGAACCCGTGGAAGCCCTC	CGCCGATGTCAGTGCCTAAAC

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los análisis estadísticos de los datos se llevaron a cabo utilizando el programa *GraphPad Prism 4.0*.

- DISEÑO EXPERIMENTAL #1: Para analizar estadísticamente los resultados obtenidos tras la exposición a corto plazo al alcohol en ratas, en cuanto a los niveles de endocannabinoides, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de 2 vías (tratamiento con alcohol x región), seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls. Por su parte, los resultados de los niveles de la enzima FAAH y del receptor CB₁ fueron analizados con una t de Student. En todos los casos se consideró un límite de probabilidad del 95% ($p < 0,05$) como estadísticamente significativo.
- DISEÑO EXPERIMENTAL #2: Los datos obtenidos al estudiar los cambios en la expresión del receptor CB₁ y de la FAAH en diferentes regiones del cerebro de ratas expuestas crónicamente a alcohol, de forma continuada o en periodos intermitentes de exposición y abstinencia fueron analizados mediante tests de ANOVA de 1 vía seguidos de tests *post-hoc* de Newman-Keuls. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.
- DISEÑO EXPERIMENTAL #3: Para poder establecer posibles interacciones entre el alcoholismo y el tipo de muerte, los datos resultantes de los análisis del receptor CB₁ y de la enzima FAAH en humanos fueron analizados mediante ANOVAs de 2 vías, seguido de un test de Student-Newman-Keuls (SNK) como test *post-hoc*. Se consideró como significación estadística un valor de $p < 0,05$.

- DISEÑO EXPERIMENTAL #4: En cuanto al estudio dirigido a evaluar el potencial ansiolítico del rimonabant durante la abstinencia alcohólica, los resultados fueron analizados mediante tests de t de Student o ANOVAs de 1 vía, en función de los datos a analizar. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.
- DISEÑO EXPERIMENTAL #5: Los datos obtenidos en los experimentos *in vitro* para determinar el posible papel neuroprotector de los cannabinoides durante la abstinencia alcohólica fueron analizados mediante ANOVAs de 1 vía y test de Student-Newman-Keuls (SNK) como *post-hoc*. De nuevo se consideró como significación estadística un valor de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

DISEÑO EXPERIMENTAL #1: Efectos de la exposición aguda al alcohol sobre los niveles de endocannabinoides, expresión de FAAH y niveles del receptor CB₁

En el primer bloque de experimentos de esta tesis quisimos analizar el estado de varios elementos del sistema cannabinoide endógeno tras la administración de alcohol a corto plazo (24 horas). En concreto, se midieron los niveles de endocannabinoides y de una serie de *N*-aciletanolaminas (NAEs) relacionadas con los endocannabinoides. También se midió la densidad de la enzima FAAH y la del receptor CB₁, todo ello en áreas cerebrales relacionadas con el estrés y la emotividad, el control motor y la ingesta.

Previamente quisimos certificar que los animales utilizados consumían de forma efectiva alcohol, ya que la cepa de ratas utilizadas en este experimento (Sprague-Dawley) no es de las cepas de animales que son preferentes por el alcohol, y por tanto podría ocurrir que no consumieran alcohol durante las 24 horas de exposición a esta sustancia. Nuestros datos indican que el consumo de líquido de los animales durante el periodo de 24 horas no fue significativamente distinto entre los grupos control y alcohol, a pesar de las propiedades aversivas del alcohol para esta variedad de rata y de una cierta tendencia a la reducción en el grupo de alcohol, en particular durante las 12 primeras horas de exposición al alcohol ($p=0,06$; tabla 13). Por lo tanto, se puede considerar que los animales del grupo alcohol fueron expuestos de forma efectiva a esa droga con un nivel de exposición equivalente a 6.6 ± 0.6 g/kg de peso. No se observó ningún efecto comportamental o signos de intoxicación en los animales.

Tabla 13. Peso e ingesta de líquido medidos en ratas en jaulas individuales donde solo tuvieron acceso a una botella con etanol (8% v/v) (alcohol) o agua (control). Los valores están expresados como promedios \pm SEM de 8 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante el test t de Student (* $p<0.05$ comparado con el grupo control).

Parámetros	Control (n=8)	Etanol (n=8)
Peso (g)	310.3 \pm 4.5	313.1 \pm 4.5
Ingesta de líquido (ml)		
0 – 12h	13.5 \pm 1.0	10.1 \pm 1.4
12 – 24h	23.0 \pm 2.0	21.8 \pm 1.4
total	36.5 \pm 2.9	31.9 \pm 2.0

Los datos obtenidos muestran que los niveles de AEA, 2-AG y de las NAEs medidos en animales controles variaron en función de la región analizada, pero se mantuvieron dentro

de las concentraciones descritas en estudios previos (Bisogno *et al.*, 1999; Bradshaw *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2002). Dentro del grupo control los niveles más altos de AEA se encontraron en la amígdala [$F(3,40) = 36,62$; $p < 0,0001$], los de 2-AG [$F(3,40) = 116,81$; $p < 0,0001$] y SEA [$F(3,40) = 38,29$; $p < 0,0001$] en el hipotálamo, y los de LEA [$F(3,40) = 2,07$; $p = 0,119$], PEA [$F(3,40) = 135,51$; $p < 0,0001$] y OEA [$F(3,40) = 32,14$; $p < 0,0001$] en el caudado-putamen (tabla 14). Los valores mas bajos se detectaron en la corteza prefrontal en el caso de AEA, 2-AG y SEA, y en la amígdala para LEA, PEA y OEA (tabla 14).

Tabla 14: Niveles de endocannabinoides y *N*-aciletanolaminas en el hipotálamo, la amígdala, el caudado-putamen y la corteza prefrontal de ratas expuestas al alcohol durante 24 h y sus controles correspondientes. Los valores son promedios \pm SEM de 8 animales en el grupo alcohol y 4 en el grupo control. Los datos se analizaron mediante el test t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ comparado con el grupo control).

Concentración (pmol/g tejido)	HIPOTÁLAMO		AMÍGDALA	
	Control	Etanol	Control	Etanol
AEA	30.06 \pm 3.46	20.32 \pm 2.46 *	53.18 \pm 5.13	32.83 \pm 3.14 **
2-AG	3311.7 \pm 258.4	2659.1 \pm 202.0	1935.8 \pm 196.6	1744.5 \pm 93.0
LEA	5.77 \pm 0.98	4.40 \pm 0.57	3.36 \pm 0.60	6.09 \pm 0.70 *
PEA	290.6 \pm 14.2	249.5 \pm 13.7	132.9 \pm 12.5	104.1 \pm 7.1
OEA	341.4 \pm 27.9	267.4 \pm 15.3 *	204.5 \pm 25.6	164.9 \pm 16.4
SEA	79.9 \pm 5.1	65.1 \pm 4.7	52.1 \pm 2.6	37.2 \pm 3.2 *

Concentración (pmol/g tejido)	CAUDADO-PUTAMEN		CORTEZA PREFRONTAL	
	Control	Etanol	Control	Etanol
AEA	25.6 \pm 2.1	19.8 \pm 1.3 *	16.7 \pm 1.4	14.6 \pm 0.6
2-AG	1022.6 \pm 98.4	974.9 \pm 56.7	558.7 \pm 31.8	413.0 \pm 15.4 ***
LEA	8.9 \pm 3.1	5.2 \pm 0.6	6.8 \pm 1.2	5.1 \pm 0.3
PEA	337.3 \pm 10.9	293.8 \pm 12.3 *	144.6 \pm 2.8	134.9 \pm 5.7
OEA	386.9 \pm 22.3	293.1 \pm 13.6 **	240.9 \pm 16.1	196.8 \pm 9.2 *
SEA	65.7 \pm 4.4	58.4 \pm 1.7	38.2 \pm 3.1	36.7 \pm 1.1

La exposición al alcohol a corto plazo produjo reducciones significativas en los niveles de todos los compuestos analizados, como reveló el análisis estadístico al analizar la variable “alcohol” [AEA: $F(1,40) = 24,4$, $p < 0,0001$; 2-AG: $F(1,40) = 6,59$, $p < 0,05$; PEA: $F(1,40) = 13,73$, $p < 0,001$; OEA: $F(1,40) = 24,25$, $p < 0,0001$; SEA: $F(1,40) = 14,21$, $p < 0,0005$]. La única excepción fue la LEA, para la que únicamente la interacción (área cerebral x tratamiento con alcohol) resultó estadísticamente significativa [$F(3,40) = 3,54$, $p < 0,05$] (tabla 14). El análisis *post*

hoc confirmó que la exposición al alcohol produjo reducciones estadísticamente significativas respecto a los controles en los niveles de AEA y OEA en el hipotálamo, mientras que el descenso en los niveles de 2-AG quedó sólo en una tendencia ($p=0,084$), al igual que en el caso de PEA ($p=0,092$) y SEA ($p=0,081$). Los niveles de LEA no se vieron modificados.

Hemos observado un patrón relativamente similar en la corteza prefrontal y en el caudado-putamen. En esa última estructura, las reducciones producidas por la exposición al alcohol llegaron a ser significativas en los casos de AEA, OEA y PEA, observándose también un descenso en los niveles de SEA y LEA, aunque en estos caso las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p=0,087$ y $p=0,132$ respectivamente) (tabla 14). Los niveles de 2-AG no se vieron afectados por el tratamiento (tabla 14). En la corteza prefrontal se observó un descenso en los niveles de 2-AG y OEA en animales expuestos al alcohol, mientras que no se observó ningún cambio en los niveles de PEA y SEA, a pesar de algunas tendencias a la reducción para la AEA ($p=0,132$) y, sobretudo, la LEA ($p=0,093$) (tabla 14).

Por su parte, la amígdala mostró un patrón de cambios diferente del resto de regiones analizadas. Fue la única de las regiones estudiadas donde se produjo un incremento en los niveles de endocannabinoides en respuesta a la exposición al alcohol, lo cual se observó únicamente en el caso de la LEA (tabla 14). El resto de los compuestos respondieron a la exposición al alcohol de la misma manera que lo que se observó en las otras regiones, con una reducción significativa en el caso de AEA y SEA, una tendencia al decremento en el caso de la PEA ($p=0,055$), y una ausencia de modificaciones en 2-AG u OEA (tabla 14).

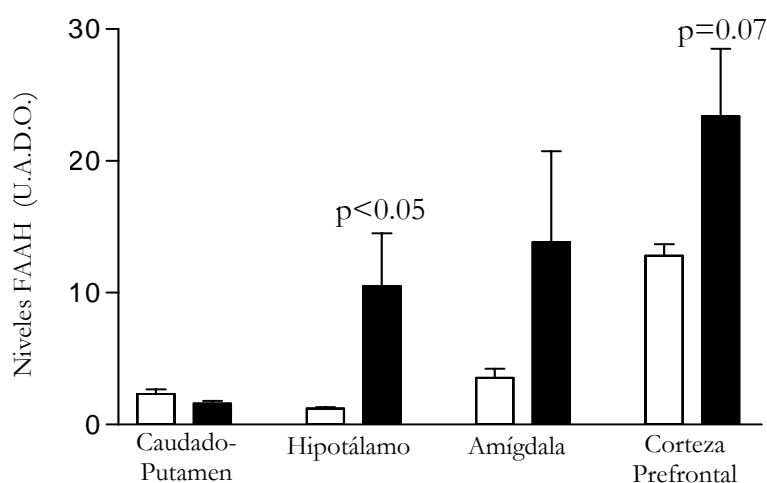


Figura 21. Niveles de FAAH medidos por *western blot* en el hipotálamo, la amígdala, el caudado-putamen y la corteza prefrontal de ratas que sólo tuvieron acceso a una botella con etanol (8% v/v) (alcohol) o agua (control) durante 24 horas. Los resultados mostrados son los promedios \pm SEM de 6-8 animales por grupo. Las comparaciones se hicieron mediante el test t de Student. Histogramas blancos, grupo control; histogramas negros, grupo alcohol agudo.

Paralelamente a los cambios en los niveles de endocannabinoides y NAEs, hemos detectado un aumento en los niveles de FAAH en las ratas expuestas al alcohol en el hipotálamo, la corteza prefrontal y, de manera menos marcada, en la amígdala (figura 21), aunque esos incrementos no llegaron a ser significativos en las dos últimas regiones (figura 21). Este hecho se debe probablemente a la alta desviación de los valores dentro del grupo alcohol, lo cual podría ser debido a algunas diferencias individuales en los niveles de alcohol a la hora del sacrificio. Sin embargo, se detectaron niveles similares de FAAH en el caudado-putamen de los animales de los grupos control y alcohol (figura 21).

Con respecto a los niveles del receptor CB₁, se observó una reducción marcada en la amígdala y la corteza prefrontal de los animales expuestos al alcohol (figura 22), aunque no se detectaron cambios ni en el hipotálamo ni en el caudado-putamen (figura 22).

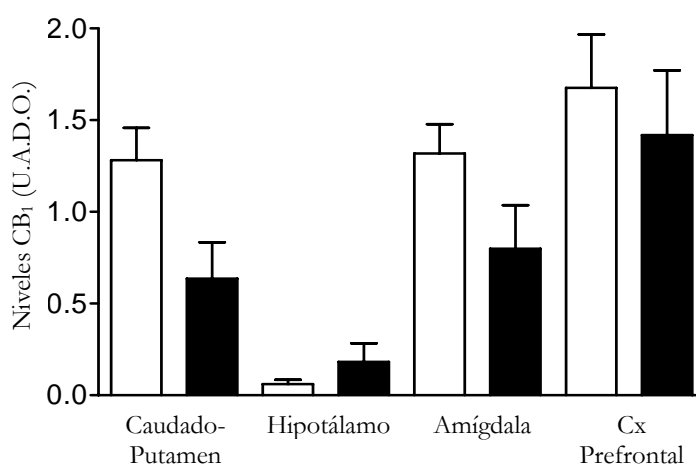


Figura 22. Niveles de CB₁ medidos por *western blot* en el hipotálamo, la amígdala, el caudado-putamen y la corteza prefrontal de ratas que sólo tuvieron acceso a una botella con etanol (8% v/v) (alcohol) o agua (control) durante 24 horas. Los resultados mostrados son los promedios \pm SEM de 6-8 animales por grupo. Las comparaciones se hicieron mediante el test t de Student. Histogramas blancos, grupo control; histogramas negros, grupo alcohol agudo.

DISEÑO EXPERIMENTAL #2: Estudio de los efectos del alcohol tras dos tipos de patrones de administración: consumo crónico ininterrumpido o consumo intermitente, sobre los niveles de expresión del receptor CB₁ y la enzima FAAH

Este experimento fue diseñado para evaluar los efectos de la administración de alcohol durante periodos prolongados de alcohol sobre la expresión de los receptores CB₁ y la enzima FAAH en varias áreas cerebrales que han sido implicadas en el circuito corticolímbico que participa en los procesos adictivos. La administración de alcohol se realizó siguiendo dos

patrones diferentes: uno ininterrumpido y otro en ciclos sucesivos de alcoholizaciones y abstinencias.

Los resultados obtenidos en el bulbo olfatorio muestran que, en los animales abstinentes, no se producen variaciones en los niveles de expresión del receptor CB_1 ni de la enzima FAAH respecto al grupo control (figura 23). Sin embargo, se ha detectado un descenso significativo frente a los grupos control y abstinentes en la expresión de CB_1 [$F(2,9)=10,10$; $p<0,01$] en el bulbo olfatorio; el descenso encontrado en esta misma área en los niveles de FAAH no alcanza significación estadística aunque evidencia una tendencia [$F(2,9)=3,044$; $p=0,0978$] (figura 23).

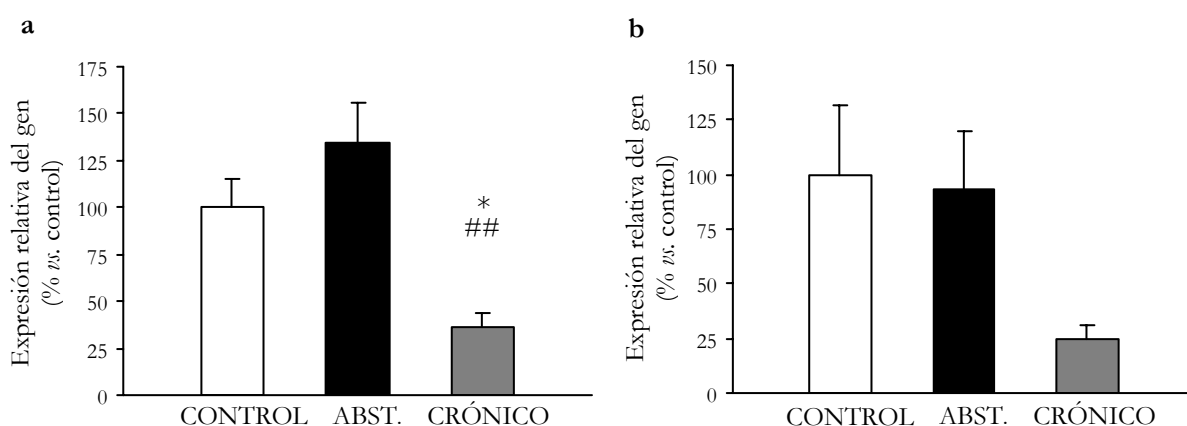


Figura 23. Cuantificación de la expresión por qPCR del receptor CB_1 (a), y FAAH (b) en bulbo olfatorio de ratas abstinentes sometidas a varios ciclos de alcohol y abstinencia (grupo ABST.) o expuestas de forma crónica al alcohol (grupo CRÓNICO). Los resultados representan la expresión relativa del gen, normalizada frente al grupo control. Resultados del ANOVA, * $p<0,05$ vs. control; ## $p<0,01$ vs. abstinencia ($n=3-4$ animales/grupo).

En cuanto a los datos de la amígdala, en los animales abstinentes no se detectan variaciones en los niveles de expresión de la enzima FAAH o el receptor CB_1 respecto al control (figura 24). En el caso de los animales expuestos de forma crónica al alcohol, hemos observado un aumento significativo en la expresión de CB_1 [$F(2,9)=25,00$; $p<0,001$], y de nuevo un incremento en la expresión de FAAH que no alcanza significación estadística, aunque sí muestra una tendencia [$F(2,9)=3,978$; $p=0,0575$] en los animales expuestos de forma crónica al alcohol (figura 24).

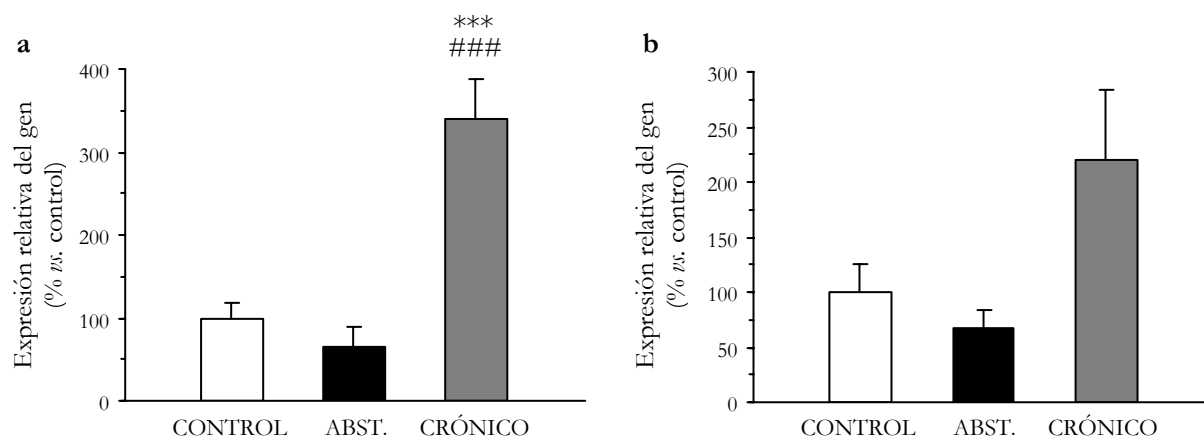


Figura 24. Cuantificación de la expresión por qPCR del receptor CB1 (a), y FAAH (b) en la amígdala de ratas abstinentes sometidas a varios ciclos de alcohol y abstinencia (grupo ABST.) o expuestas de forma crónica al alcohol (grupo CRÓNICO). Los resultados representan la expresión relativa del gen, normalizada frente al grupo control. Resultados del ANOVA, *** $p < 0,001$ vs. control; ### $p < 0,001$ vs. abstinencia ($n=3-4$ animales /grupo).

En el caso de la corteza cerebral, se ha detectado un incremento significativo en los animales abstinentes frente a los grupos control y crónico en la expresión del receptor CB₁ [$F(2,9)=10,68$; $p < 0,01$] (figura 25). En este caso no hemos detectado variaciones en los niveles de CB₁ ni FAAH en la corteza prefrontal de los animales expuestos de forma crónica al alcohol (figura 25).

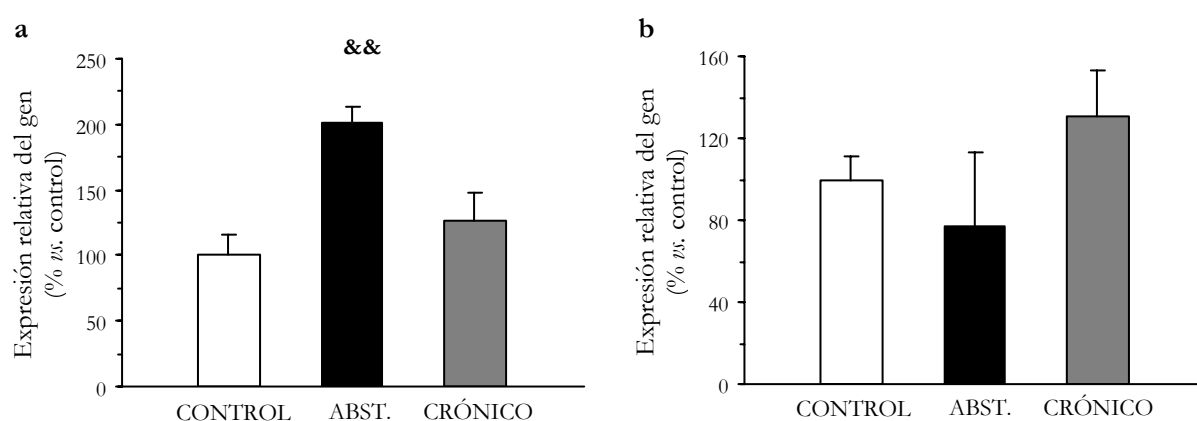


Figura 25. Cuantificación de la expresión por qPCR del receptor CB1 (a), y FAAH (b) en la corteza prefrontal de ratas abstinentes sometidas a varios ciclos de alcohol y abstinencia (grupo ABST.) o expuestas de forma crónica al alcohol (grupo CRÓNICO). Los resultados representan la expresión relativa del gen, normalizada frente al grupo control. Resultados del ANOVA, ** $p < 0,01$ vs. control; && $p < 0,01$ vs. crónico ($n=3-4$ animales /grupo).

DISEÑO EXPERIMENTAL #3: Evaluar el grado de afectación de ciertos elementos del sistema endocannabinoide en poblaciones de sujetos alcohólicos y no alcohólicos.

Otro de los objetivos de esta tesis doctoral fue tratar de extrapolar los resultados obtenidos en animales de laboratorio a muestras humanas, para ampliar así los datos que apuntarían al sistema endocannabinoide como una posible diana terapéutica en el tratamiento del alcoholismo. Por este motivo, evaluamos el estado de los receptores CB₁ (densidad y afinidad mediante ensayos de unión a radioligando) y la densidad de la enzima FAAH en varias regiones cerebrales de sujetos con historia previa de alcoholismo, comparándolos con sujetos no alcohólicos. Dentro de cada grupo se analizaron muestras de sujetos víctimas de suicidio o cuya muerte se produjo por causas naturales.

Datos en la corteza cerebral

Los resultados encontrados en la corteza cerebral de los sujetos estudiados muestran que no aparecen diferencias entre los sujetos del grupo “muerte natural” (controles *versus* alcohólicos) en la afinidad o la densidad de los receptores CB₁, ni en los niveles de expresión de la enzima FAAH (figura 26). Por el contrario, sí hemos encontrado variaciones entre los sujetos alcohólicos y no alcohólicos pertenecientes al grupo de suicidio en los diferentes parámetros estudiados. Así, hemos detectado un aumento en la densidad de los receptores CB₁ de los sujetos alcohólicos suicidas al compararlos con los controles suicidas [densidad CB₁ (fmol/mg proteína) alcohólicos suicidas= $1253,3 \pm 384,8$; controles suicidas= $740,7 \pm 46,1$; figura 26a], aunque este aumento no alcanza significación estadística debido a la gran variabilidad del grupo de alcohólicos suicidas típica de los estudios en muestras humanas. De forma paralela, hemos observado un incremento en la constante de disociación (K_d), es decir, un descenso en la afinidad de estos receptores en los sujetos alcohólicos suicidas al compararlos con los controles suicidas que, de nuevo, no alcanza significación estadística por la gran variabilidad encontrada en los dos grupos que se comparan [K_d (nM) alcohólicos suicidas= $23,8 \pm 6,5$; controles suicidas= $8,4 \pm 2,1$; ver figura 26b] [$F(1,17)=3,67$; $p=0,0723$ “alcoholismo”]. Por su parte, los niveles de FAAH muestran un aumento (aunque no significativo) en el grupo control-suicidio frente al grupo de alcohólicos suicidas [control-suicidio: $195,2 \pm 20,3$; alcoholismo-suicidio: $131,7 \pm 26,0$ (ver figura 26c); valores expresados en porcentaje frente al grupo control-muerte natural].

En este caso además también aparecen diferencias entre el tipo de muerte dentro del grupo control, ya que los suicidas presentan mayores niveles de FAAH que el grupo control-muerte natural [control-suicidio: $195,2 \pm 20,3$; control-muerte natural: $100,0 \pm 13,6$ (ver figura 26c);

valores expresados en porcentaje frente al grupo control-muerte natural] [$F(1,16)=4,584$; $p=0,0488$ “interacción”; $F(1,16)=3,08$; $p=0,0984$ factor “tipo de muerte”].

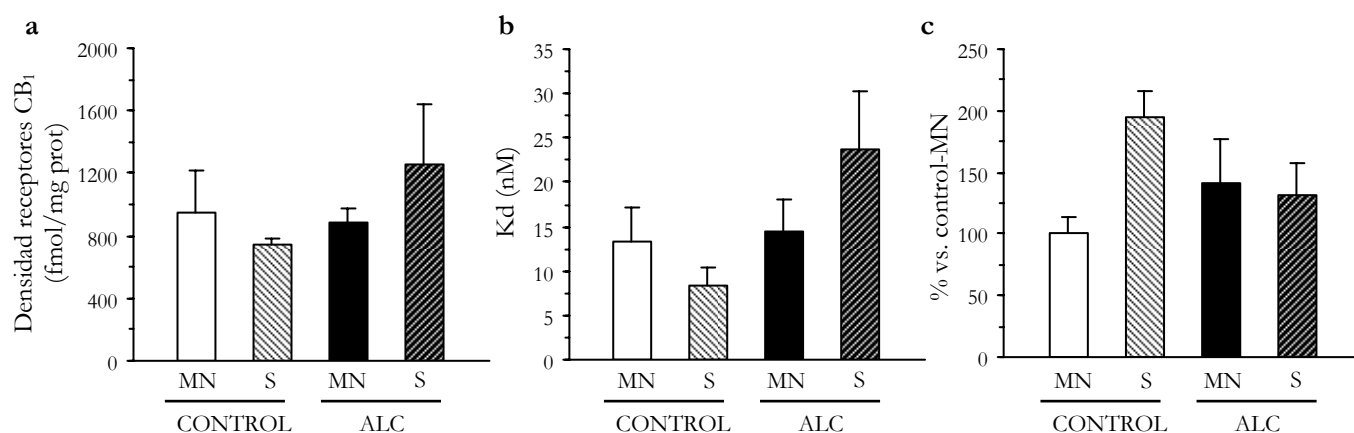


Figura 26. Densidad (Bmax) (a) y afinidad (Kd) (b) de los receptores CB₁ y niveles de enzima FAAH (c) en la corteza cerebral de sujetos controles y alcoholicos (ALC) víctimas de suicidio (S) o de muerte natural (MN). Los valores son medias \pm SEM ($n=5-6$ /grupo) en el caso de los receptores CB₁; o bien valores normalizados frente al grupo CONTROL-MN en el caso de los datos de la enzima FAAH ($n=4-6$ /grupo). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías seguido de un test SNK.

Datos en el núcleo caudado

Los resultados obtenidos en el núcleo caudado muestran un descenso significativo en la densidad de los receptores CB₁ en los sujetos suicidas tanto alcoholicos como controles, comparándolos con los sujetos del grupo “muerte natural” (tanto alcoholicos como no alcoholicos) [$F(1,18)=4,89$; $p=0,0402$ “tipo de muerte”; figura 27a]. En el caso del grupo control-suicidio, este descenso está compensado por un aumento en la afinidad de los receptores CB₁, aunque la diferencia respecto a los demás grupos no resulta estadísticamente significativa (figura 27b). Respecto a los niveles de FAAH, hemos observado un incremento en todos los grupos analizados al compararlos con el grupo control-muerte natural (figura 27c), aunque de nuevo la diferencia no alcanza significación estadística, debido a la gran variabilidad encontrada en algunos de los grupos experimentales ($F(1,14)=3,432$; $p=0,0852$ “interacción”).

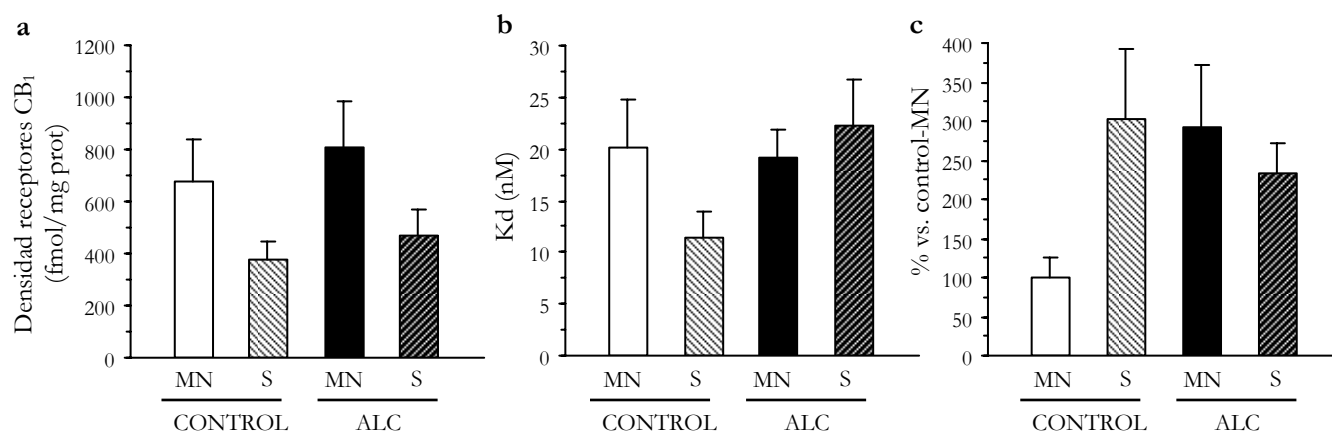


Figura 27. Densidad (Bmax) (a) y afinidad (Kd) (b) de los receptores CB₁ y niveles de enzima FAAH (c) en el núcleo caudado de sujetos controles y alcohólicos (ALC) víctimas de suicidio (S) o de muerte natural (MN). Los valores son medias \pm SEM (n=5-6/grupo) en el caso de los receptores CB₁; o bien valores normalizados frente al grupo CONTROL-MN en el caso de los datos de la enzima FAAH (n=4-6/grupo). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías seguido de un test SNK.

Datos en hipocampo

Los resultados hallados al analizar el estado de los receptores CB₁ en el hipocampo demuestran que no hay cambios entre los sujetos del grupo “muerte natural”, independientemente de que fueran alcohólicos o controles. Sin embargo, entre los sujetos suicidas, aparece un aumento en la densidad de receptores CB₁ al comparar los suicidas alcohólicos frente a los suicidas controles [densidad CB₁ (fmol/mg proteína) alcohólicos suicidas= $1047,5 \pm 155,4$; controles suicidas= $576,6 \pm 85,3$; ver figura 28a], aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo. Respecto a la afinidad de los receptores (figura 28b), en los grupos control-suicidio y alcoholismo-muerte natural hemos encontrado un incremento significativo frente al grupo control-muerte natural en la afinidad de los receptores CB₁. Dentro del grupo alcoholismo, los sujetos del grupo suicidio presentan una disminución significativa de la afinidad de los receptores CB₁, cuando se comparan con los sujetos del grupo “muerte natural” [$F(1,16)=18,59$, $p<0,001$ “interacción”]. En cuanto a los niveles de FAAH, no hemos encontrado diferencias entre ninguno de los grupos analizados (figura 28c).

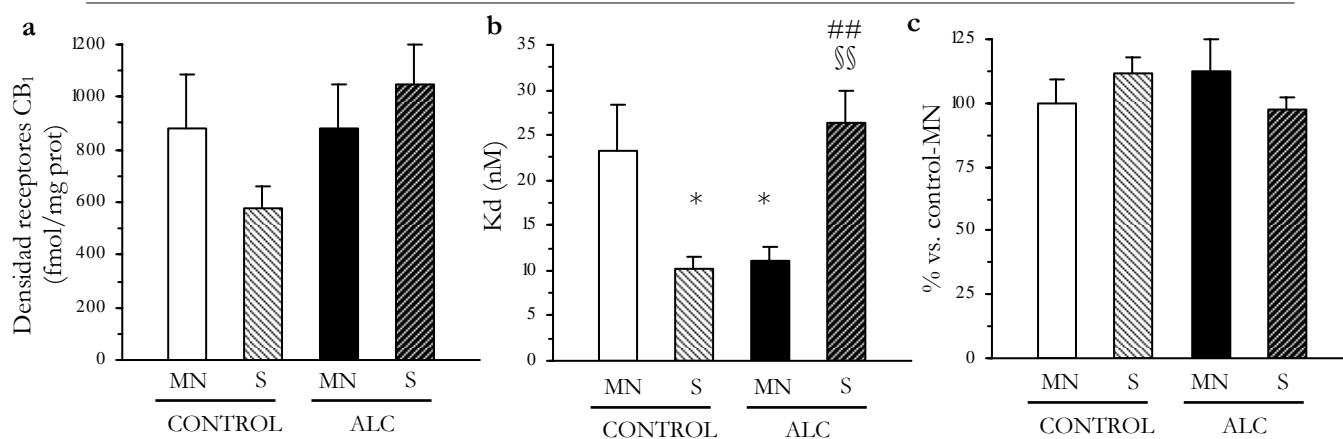


Figura 28. Densidad (Bmax) (a) y afinidad (Kd) (b) de los receptores CB₁ y niveles de enzima FAAH (c) en el hipocampo de sujetos controles y alcohólicos (ALC) víctimas de suicidio (S) o de muerte natural (MN). Los valores son medias \pm SEM (n=5-6/grupo) en el caso de los receptores CB₁; o bien valores normalizados frente al grupo CONTROL-MN en el caso de los datos de la enzima FAAH (n=5-6/grupo). * p<0,05 *vs.* control-muerte natural; ## p<0,01 *vs.* alcoholismo-muerte natural; §§, p<0,01 *vs.* control-suicidio. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías seguido de un test SNK.

Datos en cerebelo

En el caso de los análisis en cerebelo no hemos encontrado diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (densidad y afinidad de los receptores CB₁ y niveles de FAAH) (figura 29). Sin embargo, existen algunas tendencias, como en el caso del descenso en la afinidad de los receptores CB₁ observado en el grupo de sujetos alcohólicos suicidas frente al resto de grupos analizados (figura 29b) y en el incremento en los niveles de FAAH observado en los controles suicidas frente al resto de grupos (figura 29c).

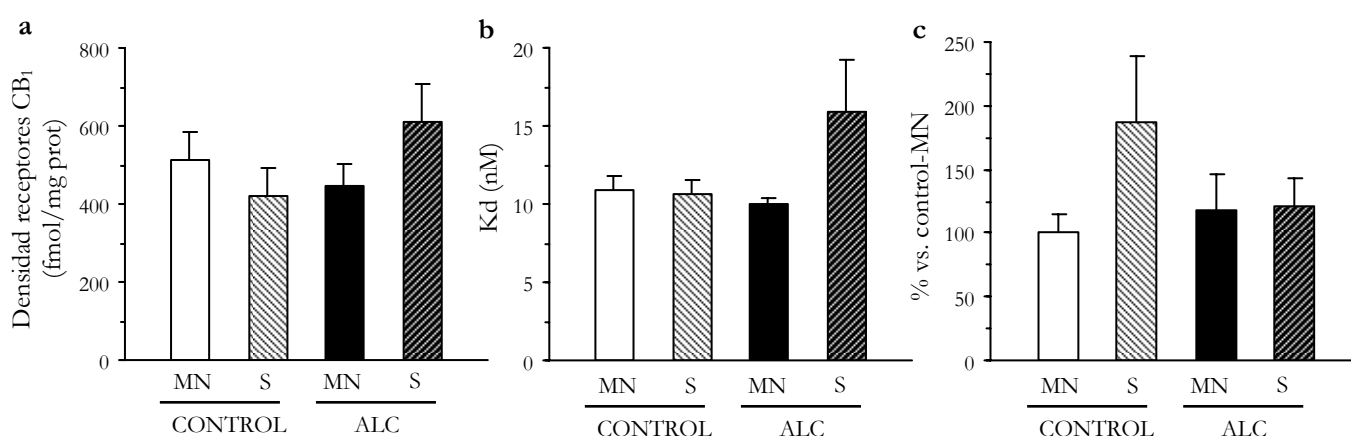


Figura 29. Densidad (Bmax) (a) y afinidad (Kd) (b) de los receptores CB₁ y niveles de enzima FAAH (c) en el cerebelo de sujetos controles y alcohólicos (ALC) víctimas de suicidio (S) o de muerte natural (MN). Los valores son medias \pm SEM (n=5-6/grupo) en el caso de los receptores CB₁; o bien valores normalizados frente al grupo CONTROL-MN en el caso de los datos de la enzima FAAH (n=4-6/grupo). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 2 vías seguido de un test SNK.

DISEÑO EXPERIMENTAL #4: Evaluación del posible efecto beneficioso del antagonista CB₁ rimonabant sobre la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica temprana, y análisis de los mecanismos neuroquímicos implicados en este efecto.

Como parte de los estudios farmacológicos realizados durante esta tesis doctoral, en este diseño experimental tratamos de evaluar la capacidad del rimonabant para mejorar uno de los signos característicos de la abstinencia como es la ansiogénesis típica del inicio de la interrupción del consumo de alcohol. Asimismo, quisimos analizar a través de qué mecanismos neuroquímicos se podría producir esta mejora comportamental y para ello analizamos los niveles de varios neurotransmisores y neuropéptidos que han sido implicados en el alcoholismo. Por último, estudiamos cual era el estado del sistema endocannabinoide en esta situación de abstinencia, en particular, en cuanto a los niveles de receptores CB₁ y de endocannabinoides.

Signos de abstinencia inducidos por la retirada de alcohol en ratas y mejora de estos síntomas por el rimonabant

Tras un periodo prolongado de exposición al alcohol, la retirada del alcohol durante 3 horas induce una serie de síntomas similares a los descritos en la abstinencia al alcohol en humanos (De Witte *et al.*, 2003; Valdez y Koob, 2004). Asimismo, los animales mostraron una marcada hiperactividad medida en el actímetro. En estos animales, la distancia total recorrida (en cm) aumentó de 1597,5 (\pm 87,5) en los controles (n=5) a 1867,7 \pm 88,1 en animales abstinentes (n=5, $p < 0,05$). De la misma manera, la velocidad media (cm/s) incrementó de 5,3 (\pm 0,3) en controles (n=5) hasta 6,1 (\pm 0,3) en animales abstinentes (n=5, $p < 0,05$), mientras el tiempo de inactividad (s) fue reducido de 76,6 \pm 4,9 en controles (n=5) hasta 63,1 (\pm 4,5) en animales abstinentes (n=5, $p < 0,05$). Sin embargo, el signo comportamental más sensible fue la respuesta ansiogénica de los animales abstinentes en el laberinto en cruz elevado. Estos animales mostraron una reducción marcada en el numero de entradas en los brazos abiertos [$F(3,41)=2.89$, $p < 0.05$; figura 30], así como en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos [$F(3,41)=3.22$, $p < 0.05$; figura 30] en comparación con los controles, lo cual concuerda con estudios previos (Baldwin *et al.*, 1991; Holter *et al.*, 1998; Rasmussen *et al.*, 2001). Dado que se observa una hiperactividad en los animales abstinentes y no una inhibición de la actividad motora, parece poco probable que la reducción en el tiempo pasado en los brazos abiertos esté relacionada con procesos motores y no con la ansiedad. De hecho, no hemos observado ninguna diferencia en el numero de entradas ni en el tiempo pasado en los brazos cerrados entre animales controles y abstinentes, confirmando la ausencia de

alteraciones motoras (figura 30). Por tanto, las diferencias de respuesta de los animales abstinentes en el laberinto en cruz elevado reflejan probablemente una situación ansiogénica. La medida de los niveles plasmáticos de corticosterona, hormona que participa de forma importante en los procesos de estrés, reveló valores similares entre controles ($88,8 \pm 19,8$ ng/mg, $n=8$), animales expuestos al alcohol ($77,2 \pm 19,3$ ng/ml, $n=9$) y abstinentes ($97,2 \pm 30,1$ ng/ml, $n=9$), lo cual indica que los niveles de estrés fueron similares en esos tres grupos.

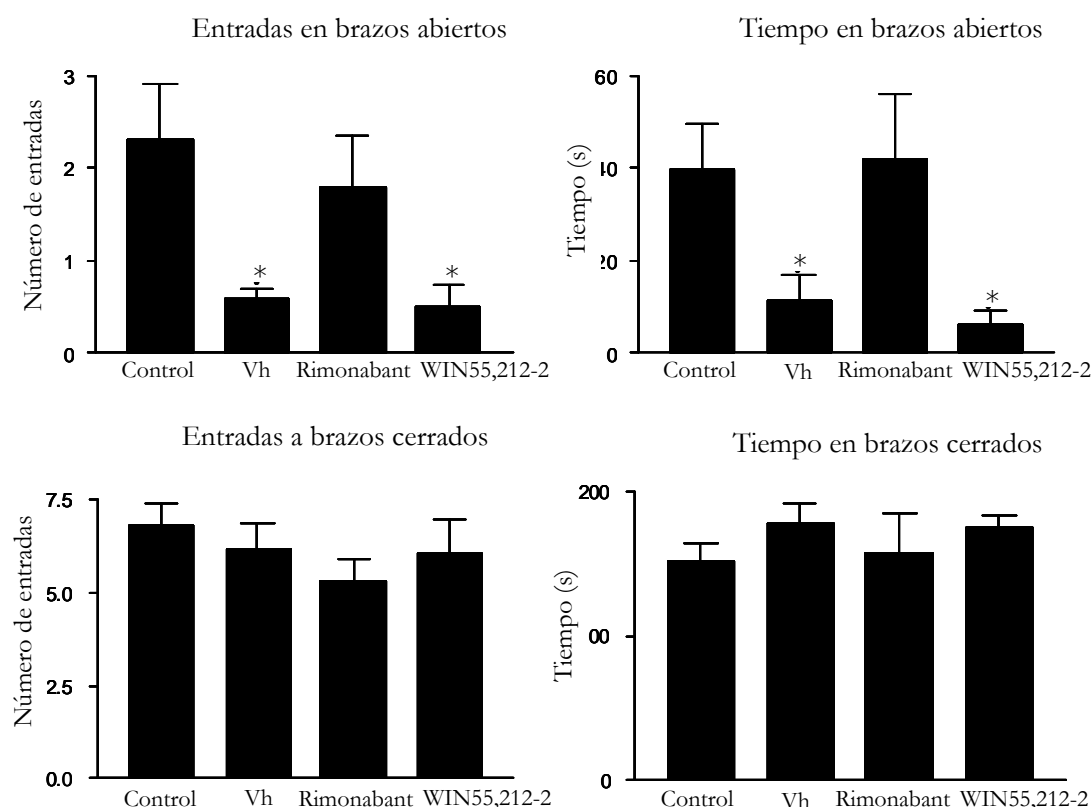


Figura 30. Respuesta comportamental en el laberinto en cruz elevado (numero de entradas y tiempo pasado en los brazos abiertos o cerrados) de ratas controles o abstinentes tratadas de forma aguda con rimonabant (0,5 mg/kg), WIN55,212-2 (1 mg/kg) o vehículo solo. Los valores representan los promedios \pm SEM de, al menos, 8 animales por grupo. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0,05$ comparado con el grupo control y el grupo rimonabant).

La administración de rimonabant a los animales abstinentes redujo la ansiedad hasta niveles similares a los controles, como se observa en los valores del número de entradas y del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (figura 30). Además, los efectos del rimonabant fueron exclusivamente ansiolíticos, pues no produjeron ningún cambio en la actividad motora a la dosis utilizada en estos experimentos. No se observó ningún efecto de este antagonista del receptor CB_1 sobre el número de entradas y el tiempo en los brazos cerrados (figura 30). Al

contrario de los datos obtenidos con el rimonabant en ratas abstinentes, la administración del agonista cannabinoide WIN55,212-2 a una dosis que no tiene efecto sobre el comportamiento motor (datos no mostrados), no indujo ningún efecto sobre la ansiedad (figura 30). Por último, queda por destacar que tanto el rimonabant como el WIN55,212-2 no produjeron ningún efecto relacionado con la ansiedad cuando se administraron a ratas controles (datos no mostrados), lo cual indica que los efectos ansiolíticos del rimonabant fueron específicos de los animales abstinentes.

Efectos del rimonabant sobre los desequilibrios neuroquímicos producidos por el alcohol en ratas abstinentes.

Además de la hiperactividad y de la ansiedad, la retirada de alcohol en ratas se acompaña también de una serie de desequilibrios neuroquímicos en áreas cerebrales que han sido directa o indirectamente vinculadas con estas respuestas comportamentales. Estos desequilibrios incluyen un descenso en la transmisión GABAérgica, como ha sido previamente descrito y se ha observado aquí por la reducción en contenidos de GABA en la corteza prefrontal, la amígdala, el caudado-putamen y el globo pálido (tabla 15 y revisión De Witte *et al.*, 2003; Koob, 2004). Sin embargo, no se encontró ningún cambio en los niveles de GABA en el área tegmental ventral, el hipotálamo, el núcleo acumbens o la sustancia nigra. (tabla 15). La abstinencia al alcohol ha sido también asociada con cambios en la transmisión glutamatérgica (revisiones en Fadda y Rossetti, 1998; De Witte *et al.*, 2003; De Witte, 2004) y, en nuestro estudio, se detectaron niveles de glutamato más altos en el caudado-putamen de las ratas abstinentes (tabla 15). Por el contrario, los niveles de glutamato descendieron en la amígdala y no sufrieron modificaciones en el resto de las estructuras estudiadas (tabla 15). También se han asociado cambios en la transmisión serotoninérgica con la abstinencia al alcohol (revisión en McBride y Li, 1998) pero en nuestro experimento los niveles de serotonina aumentaron sólo en el hipotálamo, y no variaron en el resto de las estructuras estudiadas (tabla 15). No se han observado cambios significativos en los niveles de noradrenalina en ninguna de las áreas analizadas (corteza prefrontal, área tegmental central, amígdala y caudado-putamen; tabla 15), ni en la dopamina en el hipotálamo, el caudado-putamen, el núcleo acumbens y la corteza prefrontal (tabla 15). Aun así, los contenidos en dopamina sufrieron un descenso en el área tegmental ventral y la amígdala (tabla 15). La administración de rimonabant a ratas abstinentes corrigió algunos de esos desequilibrios neuroquímicos, mientras que no produjo ningún cambio en ratas controles (datos no mostrados). Por ejemplo, el descenso en GABA inducido por la abstinencia fue completamente revertido en la corteza prefrontal y el caudado-putamen por el tratamiento con

rimonabant y este tratamiento también matizó los cambios encontrados en el globo pálido (tabla 15). En contraste, el rimonabant no tuvo ningún efecto sobre el incremento en contenidos de GABA en la amígdala o sobre la reducción de los niveles de glutamato en esa misma área (tabla 15). Sin embargo, el bloqueo de los receptores CB₁ sí redujo el incremento en glutamato en el caudado-putamen de las ratas abstinentes (tabla 15), aunque no se han observado efectos sobre los contenidos de serotonina en el hipotálamo (tabla 15). Además, el rimonabant influyó sobre la transmisión dopaminérgica, produciendo una atenuación de la reducción encontrada en el área tegmental ventral y la amígdala de las ratas abstinentes (tabla 15).

Parámetros	Control	Abstinencia		Estadísticas
		+ vehículo	+ rimonabant	
GABA (µg/mg proteína)				
Hipotálamo	13.1 ± 2.2	17.4 ± 2.8	13.2 ± 2.1	ns
Núcleo accumbens	3.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.5 ± 0.2	ns
Corteza prefrontal	2.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2**	1.9 ± 0.2#	F(2,22)=5.184, p<0.05
Área tegmental ventral	2.5 ± 0.4	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.1	ns
Amígdala	6.1 ± 0.5	4.2 ± 0.4*	4.0 ± 0.5*	F(2,22)=5.869, p<0.01
Caudado-putamen	4.3 ± 0.6	3.0 ± 0.3*	4.0 ± 0.3#	F(2,22)=3.752, p<0.05
Globo pálido	4.2 ± 0.4	2.7 ± 0.3**	3.1 ± 0.2*	F(2,22)=6.335, p<0.01
Sustancia nigra	6.2 ± 0.8	5.9 ± 0.5	5.6 ± 0.6	ns
Glutamato (µg/mg proteína)				
Núcleo accumbens	22.8 ± 2.0	20.9 ± 2.4	22.5 ± 3.9	ns
Corteza prefrontal	28.1 ± 4.2	29.6 ± 6.3	25.7 ± 2.5	ns
Área tegmental ventral	18.1 ± 3.7	15.7 ± 2.0	18.2 ± 0.6	ns
Amígdala	40.7 ± 3.0	33.6 ± 2.8*	28.9 ± 1.3**	F(2,21)=5.039, p<0.05
Caudado-putamen	14.8 ± 0.8	23.9 ± 2.7*	18.0 ± 1.6#	F(2,22)=5.591, p<0.05
Globo pálido	16.4 ± 1.4	15.9 ± 2.7	15.8 ± 2.1	ns
Serotonina (ng/mg proteína)				
Hipotálamo	3.4 ± 0.6	12.5 ± 1.9***	14.0 ± 1.1***	F(2,21)=19.3, p<0.0001
Núcleo accumbens	5.7 ± 0.8	8.3 ± 1.9	9.9 ± 1.5	ns
Corteza prefrontal	1.9 ± 0.4	3.4 ± 1.1	2.8 ± 0.4	ns
Área ventral tegmental	13.0 ± 2.6	11.5 ± 5.1	13.3 ± 4.4	ns
Amígdala	6.4 ± 1.1	7.5 ± 0.5	8.4 ± 1.2	ns
Caudado-putamen	5.6 ± 1.1	4.7 ± 0.6	5.6 ± 1.3	ns
Globo pálido	6.1 ± 1.1	4.4 ± 0.6	4.3 ± 0.9	ns
Sustancia nigra	11.5 ± 2.7	10.3 ± 1.2	11.4 ± 2.2	ns
Dopamina (ng/mg proteína)				
Hipotálamo	4.4 ± 0.4	5.1 ± 0.7	3.7 ± 0.5	ns
Núcleo accumbens	89.5 ± 4.0	83.1 ± 12.2	89.2 ± 9.5	ns
Corteza prefrontal	3.4 ± 0.4	3.8 ± 0.4	5.0 ± 0.7	ns
Área tegmental ventral	9.0 ± 1.7	4.1 ± 0.9*	7.1 ± 1.4#	F(2,22)=3.24, p<0.05
Amígdala	2.5 ± 0.3	1.4 ± 0.2*	2.0 ± 0.3	F(2,22)=4.14, p<0.05
Caudado-putamen	69.2 ± 3.2	85.2 ± 7.6	79.4 ± 5.4	ns
Noradrenalina (ng/mg proteína)				
Corteza prefrontal	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2	ns
Área tegmental ventral	5.5 ± 0.7	4.2 ± 0.5	4.2 ± 0.1	ns
Amígdala	5.0 ± 0.5	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.3	ns
Caudado-putamen	3.3 ± 2.4	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.2	ns

Tabla 15. Concentraciones en neurotransmisores en diferentes estructuras del cerebro de ratas controles o abstinentes, tratadas con una administración aguda de rimonabant (0,5 mg/kg) o de vehículo. Los valores son promedio ± SEM de 6-8 animales por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVAs de 1 vía, seguidos del test de Student-Newman-Keuls test (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005 comparando con las ratas controles; #p<0,05 comparando con las ratas inyectadas con vehículo).

En nuestro experimento, la abstinencia al alcohol apareció también asociada a cambios en la expresión de diversos neuropéptidos vinculados con la adicción al alcohol, tales como la encefalina (ENK, Cowen *et al.*, 2004) y el neuropéptido Y (NPY; Schroeder *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004). En cambio, en nuestro estudio, no observamos efectos de la abstinencia sobre la expresión del ARNm del precursor de la encefalina, la proencefalina (PENK), en las diferentes regiones analizadas, ya sea en comparación con las ratas controles o con las que recibieron rimonabant (tabla 16). De la misma manera, la abstinencia al alcohol no afectó a la expresión del ARNm del NPY en el tálamo y la amígdala, pero redujo de forma marcada los transcritos de este neuropéptido en el núcleo arcuado (tabla 16). Sin embargo, la administración de rimonabant no revertió ese incremento (tabla 16). Hemos analizado también el CRF, un neuropéptido relacionado con la retirada del alcohol (Heinrichs y Koob, 2004), y en particular con la recaída (Lê y Shaham, 2002). Aun así, no han sido detectados cambios relevantes en el ARNm del CRF ni durante la abstinencia al alcohol ni tras la administración de rimonabant en ninguna de las áreas consideradas (tabla 16).

Tabla 16. Expresión del ARNm de neuropéptidos en diferentes estructuras cerebrales de ratas controles o abstinentes tratadas con rimonabant (0,5 mg/kg) o vehículo. Los valores son promedios \pm SEM de 5-8 animals por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVAs de 1 vía seguidos del test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al grupo control).

Parámetros	Control	Abstinencia		Estadísticas
		+ vehículo	+ rimonabant	
Proencefalina (densidad óptica)				
Caudado-putamen	0.28 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03	ns
Corteza piriforme	0.32 \pm 0.04	0.30 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	ns
Núcleo septal lateral	0.10 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.01	ns
Núcleo accumbens	0.24 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	ns
Núcleo ventromedial hipotalámico	0.19 \pm 0.03	0.27 \pm 0.06	0.30 \pm 0.06	ns
Núcleo paraventricular hipotalámico	0.15 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03	0.15 \pm 0.04	ns
Cuerpos mamilares	0.18 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03	0.17 \pm 0.01	Ns
Neuropéptido Y (densidad óptica)				
Núcleos talámicos	0.18 \pm 0.04	0.19 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	ns
Amígdala	0.16 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	ns
Núcleo arcuado	0.77 \pm 0.04	0.55 \pm 0.03**	0.57 \pm 0.03**	F(2,20)=11.5, $p < 0.01$
CRF (densidad óptica)				
Núcleos talámicos	0.21 \pm 0.03	0.16 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	ns
Amígdala	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	ns
Hipotálamo anterior	0.26 \pm 0.05	0.17 \pm 0.02	0.23 \pm 0.03	ns

Cambios en la señalización endocannabinoide en ratas abstinentes al alcohol.

La capacidad del rimonabant para normalizar las alteraciones comportamentales y, en parte, neuroquímicas, inducidas por la interrupción del consumo regular de alcohol en ratas sugiere que la señalización endocannabinoide, particularmente a través del receptor CB₁, podría estar aumentada en ciertas regiones cerebrales de los animales abstinentes. Por este

motivo, analizamos el número de receptores CB₁ y el nivel de producción de endocannabinoides y de otras NAEs en diferentes áreas del cerebro de ratas abstinentes, comparándolos con animales controles. Hemos detectado una reducción significativa en la densidad de receptores CB₁ en el globo pálido y la sustancia nigra de los animales abstinentes, sin que aparezcan cambios en el caudado-putamen, la corteza o la amígdala (tabla 17). Los niveles de AEA sufrieron un descenso en la amígdala y el caudado-putamen de las ratas abstinentes, mientras que tendieron a disminuir en el hipotálamo (tabla 17). Sin embargo, no se observó ningún efecto en el caso del otro principal endocanabinoide, el 2-AG (tabla 17), aunque se detectaron reducciones en algunas NAEs (tabla 17); así, hemos observado menores niveles de PEA, LEA, OEA y SEA en el caudado putamen de las ratas abstinentes, así como un descenso de los niveles de LEA en la amígdala (tabla 17).

Tabla 17. Densidad de receptores CB₁ y concentraciones de endocannabinoides y de NAEs en diferentes estructuras cerebrales de ratas controles o abstinentes al alcohol. Los valores son promedios \pm SEM de 5-8 animales por grupo. Los datos fueron analizados mediante el test t de Student (*p<0,05, **p<0,01).

Parámetros	Control	Abstinencia
Densidad de receptores CB₁ (fmol/mg proteína)		
Corteza cerebral	67.1 \pm 20.1	75.1 \pm 10.1
Caudado-putamen	87.5 \pm 19.8	107.1 \pm 9.8
Globo pálido	242.1 \pm 30.1	154.1 \pm 20.1*
Substancia nigra	234.5 \pm 19.6	153.9 \pm 29.6*
Amígdala	41.0 \pm 9.8	59.7 \pm 19.8
Anandamida (pmol/g tejido)		
Hipotálamo	11.0 \pm 2.7	8.7 \pm 1.1
Amígdala	29.5 \pm 6.0	15.5 \pm 0.9*
Caudado-putamen	27.0 \pm 5.8	12.0 \pm 0.6*
2-araquidonoilglicerol (nmol/g tejido)		
Hipotálamo	2.49 \pm 0.29	2.92 \pm 0.32
Amígdala	1.78 \pm 0.23	1.70 \pm 0.05
Caudado-putamen	1.04 \pm 0.08	0.81 \pm 0.10
Palmitoiletanolamida (pmol/g tejido)		
Hipotálamo	166.7 \pm 16.4	150.1 \pm 11.7
Amígdala	88.8 \pm 12.2	76.9 \pm 2.6
Caudado-putamen	247.5 \pm 12.1	198.0 \pm 11.9**
Linoleoiletanolamida (pmol/g tejido)		
Hipotálamo	4.4 \pm 0.8	4.6 \pm 0.5
Amígdala	6.4 \pm 0.9	4.2 \pm 0.4*
Caudado-putamen	5.1 \pm 0.4	3.9 \pm 0.3*
Oleoiletanolamida (pmol/g tejido)		
Hipotálamo	163.1 \pm 29.3	168.4 \pm 10.2
Amígdala	128.7 \pm 25.0	104.8 \pm 8.0
Caudado-putamen	307.7 \pm 29.1	210.6 \pm 25.3*
Estearoiletanolamida (pmol/g tejido)		
Hipotálamo	53.9 \pm 7.4	41.6 \pm 2.4
Amígdala	36.7 \pm 6.5	27.9 \pm 2.2
Caudado-putamen	72.6 \pm 9.4	40.9 \pm 4.2**

DISEÑO EXPERIMENTAL #5: Papel de los cannabinoides en un modelo *in vitro* de alcoholización crónica y abstinencia

Dentro del bloque de estudios dirigidos al estudio del potencial terapéutico de los cannabinoides en el alcoholismo, quisimos explorar un aspecto que no ha sido aún analizado en el campo de la neuroprotección mediada por cannabinoides, como es el caso del desarrollo de tolerancia al alcohol y la subsecuente situación de hiperexcitabilidad neuronal que aparece al interrumpir el consumo de alcohol, que puede conducir a procesos neurodegenerativos. Para ello, desarrollamos un modelo *in vitro* de alcoholización crónica y abstinencia, en el que estudiamos, en primer lugar, el posible efecto tóxico de la propia administración crónica de alcohol, así como de la posterior abstinencia, sobre las neuronas. Asimismo, analizamos el posible incremento en la sensibilidad al daño excitotóxico en este modelo. En segundo lugar, quisimos estudiar el posible desarrollo de neuroadaptaciones en los sistemas cannabinoide, glutamatérgico y GABAérgico tras la administración crónica de alcohol. En tercer lugar, quisimos evaluar, durante la situación particular de abstinencia alcohólica, por un lado, el papel de los agonistas cannabinoides; y por otro lado, las acciones del antagonista CB₁ SR141716. Por último, analizamos los posibles efectos de estos cannabinoides sobre la expresión de las neuroadaptaciones producidas durante la alcoholización crónica.

Efecto de la administración crónica de alcohol y posterior abstinencia sobre la sensibilidad al daño excitotóxico inducido por NMDA

En nuestro estudio hemos desarrollado un modelo de alcoholización y posterior abstinencia en cultivos de neuronas a los que se administra alcohol durante 5 (grupo alcohol crónico) o 3 días consecutivos (grupo abstinencia). En este modelo no se detectan variaciones en el nivel basal de muerte celular debida al tratamiento crónico con alcohol durante 5 días o a la abstinencia durante 48 horas tras tres días de alcoholización (figura 31). Sin embargo, aparece un marcado incremento en la sensibilidad de las neuronas del grupo de abstinencia al daño excitotóxico inducido por la administración de NMDA 10 μ M en el medio de cultivo durante 24 horas, cuando se comparan con la situación control [$F(5,114)=91,10$; $p<0,0001$] (figura 31). En el caso de la alcoholización crónica, el nivel de muerte neuronal inducida por la presencia de NMDA es significativamente menor que en los controles expuestos a NMDA (figura 31).

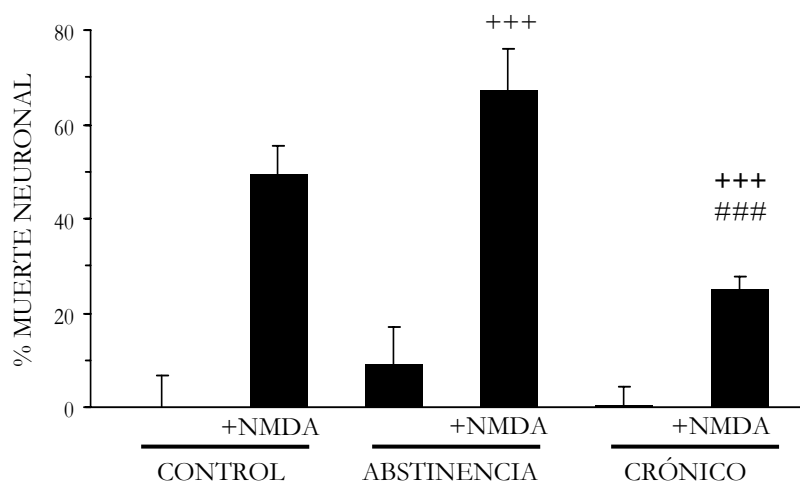


Figura 31. Efecto de la exposición crónica al alcohol y de la abstinencia inducida en cultivos primarios de neuronas sobre el nivel de muerte neuronal (estimada por la medida de la liberación de LDH al medio de cultivo). Los tratamientos con alcohol (exposición crónica o abstinencia) *per se* no inducen cambios en la supervivencia neuronal. La exposición a NMDA 10 μ M durante 24 horas provoca mayor muerte neuronal en la situación de abstinencia cuando se compara con el control, y menor cuando el etanol es administrado de forma crónica. Los valores son medias \pm SEM ($n=16-20$ pocillos/condición). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls. +++ $p<0,001$ *vs.* abstinencia; ### $p<0,001$ *vs.* abstinencia-NMDA.

Efecto inhibitor del etanol sobre los receptores NMDA.

Para tratar de explicar el efecto aparentemente neuroprotector que aparece en la situación de alcoholización crónica y analizar una posible inhibición directa del etanol sobre los receptores NMDA, realizamos un experimento con neuronas nunca expuestas al alcohol a las que se añadió o no etanol en el momento de la administración de NMDA. Los resultados muestran que el etanol, administrado de forma aguda no induce modificaciones en la supervivencia celular (figura 32). La administración de NMDA 10 μ M durante 24 horas provoca muerte neuronal, que resultó ser inhibida por la presencia conjunta de etanol en el medio de cultivo [$F(3,48)=51,40$; $p<0,001$] (figura 32).

Análisis de la expresión por PCR cuantitativa de varios de los genes implicados en el desarrollo de tolerancia y manifestación de la abstinencia.

Para tratar de esclarecer los mecanismos moleculares a través de los cuales se produce el incremento observado en la sensibilidad al daño excitotóxico, analizamos los niveles de expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A, las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA, y la expresión del receptor CB₁ y la enzima FAAH, en las condiciones de alcoholización crónica y abstinencia (tabla 18). Los resultados obtenidos

muestran una tendencia a la baja de la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A en la condición alcohol crónico, y un aumento no significativo de la expresión de la subunidad $\beta 3$ del receptor GABA_A (tabla 18). Además, aparece un marcado descenso en los niveles de la subunidad NR2A en ambas condiciones experimentales [$F(2,12)=6,609$; $p<0,05$].

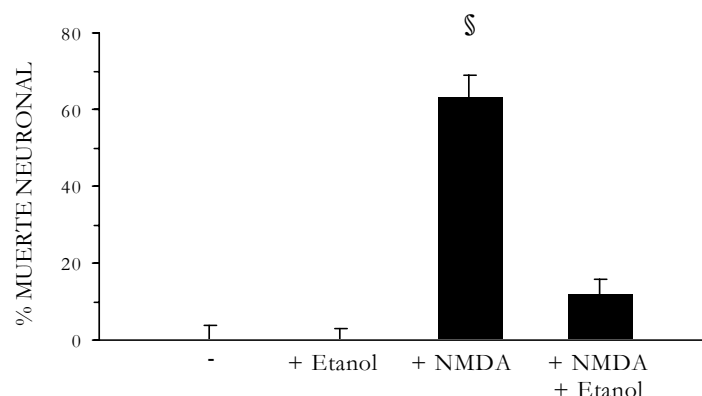


Figura 32. Efecto inhibitor del etanol sobre los receptores NMDA. El etanol administrado de forma aguda no induce modificaciones en la supervivencia neuronal (estimada por la medida de la liberación de LDH al medio de cultivo). La administración de NMDA 10 μ M durante 24 horas provoca muerte neuronal, que es inhibida por la presencia conjunta de etanol en el medio de cultivo. Los valores son medias \pm SEM ($n= 10$ -13 pocillos/condición). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls. §, $p<0,001$ *vs.* control, control+etanol, control+NMDA+ etanol. No se encontraron diferencias entre los grupos control, control+etanol, control+NMDA + etanol.

Tabla 16. Cuantificación de la expresión por PCR cuantitativa de varios de los genes implicados en el desarrollo de tolerancia y manifestación de la abstinencia. Los resultados representan la expresión relativa del gen, normalizada frente al grupo control ($n=12$ -15 pocillos/condición). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls * $p<0,05$ *vs.* control.

GRUPO EXPERIMENTAL			
GEN ANALIZADO	CONTROL	ABSTINENCIA	CRÓNICO
CB1	100 \pm 38,0	133,1 \pm 29,5	159,5 \pm 23,6
FAAH	100 \pm 15,7	88,8 \pm 10,0	91,1 \pm 10,4
GABA _A	$\alpha 1$	100 \pm 19,1	81,1 \pm 12,3
	$\alpha 4$	100 \pm 25,0	76,2 \pm 14,5
	$\beta 3$	100 \pm 25,1	114,1 \pm 24,6
NMDA	NR 2A	100 \pm 26,7	50,7 \pm 13,7 *
	NR 2B	100 \pm 20,8	57,9 \pm 15,4
	NR1	100 \pm 25,1	99,9 \pm 22,9

Efecto de la administración crónica del agonista cannabinoide HU210 o el antagonista CB₁ SR141716 durante el tratamiento con etanol y posterior abstinencia

En esta parte del estudio quisimos evaluar el posible papel beneficioso de la administración del agonista cannabinoide HU210 y del antagonista CB₁ SR141716. Para ello, añadimos cada compuesto a diferentes cultivos durante el periodo de alcoholización y la posterior abstinencia. Los resultados muestran que el HU210 tiene un efecto neuroprotector frente al daño inducido por la presencia de NMDA exclusivamente en el caso de la situación de abstinencia al alcohol [$F(5,66)=11,54$; $p<0,01$], sin que aparezca un efecto neuroprotector en la situación control (figura 33). No se detectó ningún efecto debido al HU210 en ausencia de NMDA (datos no mostrados), en ninguna de las condiciones del ensayo.

Con respecto al SR141716, hemos observado una potenciación del daño excitotóxico tras la administración de NMDA al cultivo, tanto en los controles [$F(7,64)=67,60$; $p<0,01$] como en la condición de abstinencia (figura 33). No se detectó ningún efecto debido al SR141716 en ausencia de NMDA (datos no mostrados), en ninguna de las condiciones del ensayo.

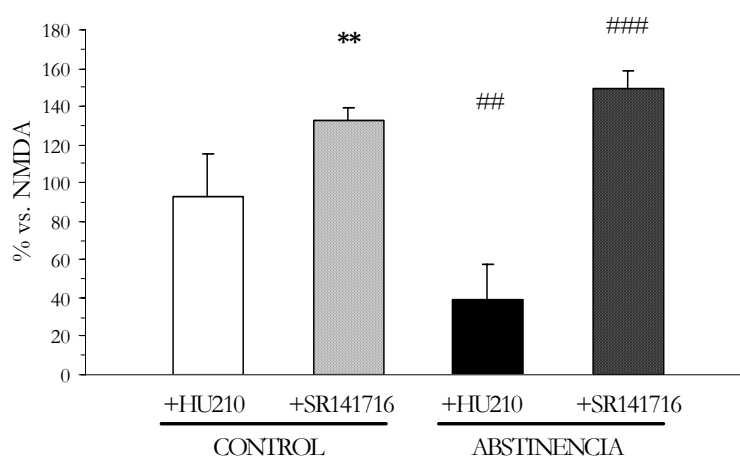


Figura 33. Efecto de la administración crónica del agonista cannabinoide HU210 (1 μ M) o el antagonista CB₁ SR141716 (1 μ M) durante el tratamiento con etanol y posterior abstinencia, tras exponer al cultivo a NMDA 10 μ M durante 24h y medir la liberación de LDH al medio. Los valores están expresados en % frente al grupo NMDA correspondiente en cada caso (control o abstinencia). El HU210 tiene un efecto neuroprotector frente al daño inducido por la presencia de NMDA exclusivamente en el caso de la situación de abstinencia al alcohol. El SR141716 potencia el daño excitotóxico tanto en los controles como en la condición de abstinencia. Los valores son medias \pm SEM ($n=4-12$ pocillos/condición). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls ** $p<0,01$ vs. control-NMDA; ## $p<0,01$ vs. abstinencia-NMDA; ### $p<0,001$ vs. abstinencia-NMDA.

Efecto de la administración subcrónica del agonista cannabinoide HU210 durante el periodo de abstinencia a alcohol

Puesto que en el experimento anterior se vio que el HU210 tenía un papel neuroprotector frente al daño excitotóxico inducido por NMDA durante la abstinencia al alcohol, quisimos a continuación determinar si este efecto neuroprotector depende de la administración crónica de este agonista previa al momento de la abstinencia, o bien si esta neuroprotección aparece incluso al administrar HU210 únicamente desde el inicio de la abstinencia. Los resultados muestran que el efecto neuroprotector de este compuesto sobre la neurotoxicidad inducida por la presencia de NMDA aparece exclusivamente en la situación de abstinencia al alcohol [$F(5,66)=19,22$; $p<0,001$] (figura 34).

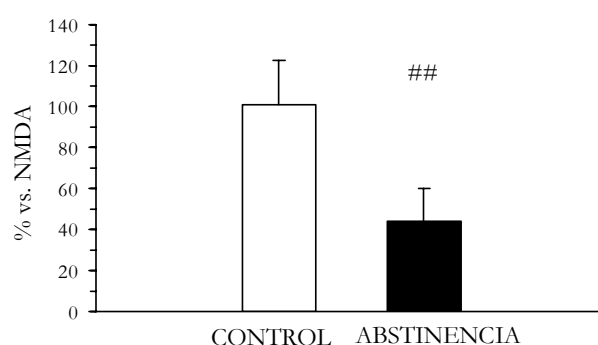


Figura 34. Efecto de la administración subcrónica del agonista cannabinoide HU210 (1 μ M) durante el periodo de abstinencia a alcohol, tras exponer al cultivo a NMDA 10 μ M durante 24h y medir la liberación de LDH al medio. Los valores están expresados en porcentaje frente al grupo NMDA correspondiente en cada caso (control o abstinencia). El HU210 tiene un efecto neuroprotector sobre la neurotoxicidad inducida por la presencia de NMDA exclusivamente en la situación de abstinencia al alcohol. Los valores son medias \pm SEM ($n=6-8$ pocillos/condición). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls $## p<0,01$ *vs.* abstinencia-NMDA.

Análisis de la expresión de las subunidades NR2A del receptor NMDA y $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A, tras la coadministración de cannabinoides durante la alcoholización y posterior abstinencia

Para determinar el posible bloqueo de los cambios neuroadaptativos que tienen lugar durante la exposición crónica al alcohol (relacionados con los procesos de hiperexcitabilidad neuronal que aparecen en la abstinencia al alcohol), realizamos un co-tratamiento con cannabinoides y etanol durante el proceso de alcoholización y posterior abstinencia y

analizamos los posibles cambios en la expresión génica de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor $GABA_A$ y la subunidad NR2A del receptor NMDA, tanto en la situación alcohol crónico como en la situación de abstinencia.

No hemos observado cambios en la expresión de ninguna de estas subunidades tras el tratamiento con HU210 en ninguna de las condiciones analizadas (tabla 19). La administración de SR141716 en la situación de alcoholización crónica provocó un descenso significativo de los niveles de ARNm de la subunidad NR2A respecto a los controles [$F(2,9)= 4,906$; $p<0,05$] (tabla 19), y en la situación de abstinencia se produjo también un descenso en los niveles de esta subunidad, en este caso significativo frente al grupo tratado con HU210 [$F(2,9)= 5,429$; $p<0,05$] (tabla 19). Los niveles de ARNm de la subunidad $\beta 3$ del receptor $GABA_A$ también sufrieron un descenso significativo en la situación de abstinencia frente a su grupo control y al grupo tratado con HU210 [$F(2,9)= 6,764$; $p<0,05$] (tabla 19). En el caso de la subunidad $\alpha 1$ de este mismo receptor también hemos encontrado, en la situación de abstinencia, un descenso tras el tratamiento con SR141716, aunque en este caso no alcanza significación estadística ($p=0,0537$). El resto de genes estudiados también sufrieron un descenso en sus niveles, aunque este caso las diferencias no alcanzaron significación estadística (tabla 19).

Tabla 19. Resultados qPCR tras coadministración de alcohol y cannabinoides. Los resultados representan la expresión relativa del gen, normalizada frente al grupo control (n=8-16 pocillos/condición; N = 2-4 placas). Los datos fueron analizados mediante un test de ANOVA seguido de un test de Student-Newman-Keuls. * $p<0.05$ vs. +DMSO; & $p<0.05$ vs. +HU; # $p<0.05$ vs. +SR.

		TRATAMIENTO		
GRUPO		+DMSO	+HU210	+SR141716
GABA _A $\alpha 1$	CONTROL	100 \pm 24	98,8 \pm 12,3	123,7 \pm 21,2
	ABSTINENCIA	100 \pm 16,9	103,3 \pm 21,3	39,7 \pm 24,7
	CRÓNICO	100 \pm 26,4	45,5 \pm 3,0	59,7 \pm 38,2
GABA _A $\beta 3$	CONTROL	100 \pm 38,2	152,6 \pm 25,7	146,1 \pm 126,7
	ABSTINENCIA	100 \pm 9,7	99,7 \pm 9,6	51,8 \pm 18,9 * &
	CRÓNICO	100 \pm 10,5	64 \pm 22,9	61 \pm 21,3
NR2A	CONTROL	100 \pm 47,4	62,2 \pm 3,2	103,6 \pm 3,6
	ABSTINENCIA	100 \pm 11,7	120,5 \pm 20,8	59,4 \pm 9,5 &
	CRÓNICO	100 \pm 22,9	63 \pm 14,2	33,3 \pm 4,4 *

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La tesis doctoral presentada aporta nuevos datos acerca de las importantes implicaciones del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo. Los trabajos realizados se han dirigido al estudio de dos cuestiones fundamentales de la relación del sistema endocannabinoide y el alcoholismo: la primera de ellas se centra en los efectos del consumo de alcohol sobre este sistema de neuromodulación desde un punto de vista que podría considerarse más bioquímico, mientras que la segunda incide, desde un aspecto más farmacológico, en las posibilidades terapéuticas del sistema endocannabinoide de una forma más directa, a través del empleo de agonistas o antagonistas cannabinoides en la terapia del alcoholismo. De este modo, los experimentos realizados a lo largo de esta tesis doctoral han sido agrupados alrededor de cinco diseños experimentales. En los dos primeros, se han estudiado los efectos del consumo de alcohol sobre el sistema cannabinoide en animales de laboratorio, haciendo hincapié principalmente en varias condiciones de administración de alcohol: (i) el consumo a corto plazo, y (ii) la administración crónica ininterrumpida o el consumo crónico con alternancia de periodos de alcoholización y abstinencias. El tercer objetivo de esta tesis doctoral fue el análisis del estado de dos elementos importantes del sistema cannabinoide endógeno (los receptores CB₁ y la enzima FAAH) en muestras de diversas áreas cerebrales pertenecientes a sujetos alcohólicos y no alcohólicos víctimas de suicidio o cuya muerte fue debida a causas naturales. A partir de aquí, los diseños experimentales realizados en el resto de la tesis se centraron más en el estudio del potencial terapéutico de los cannabinoides en el alcoholismo. En el cuarto diseño experimental evaluamos el potencial terapéutico del antagonista del receptor CB₁ rimonabant en la sintomatología comportamental asociada a la abstinencia temprana al alcohol, y analizamos los mecanismos neuroquímicos implicados en las acciones beneficiosas encontradas tras la administración de este compuesto a los animales abstinentes. Por último, desarrollamos un modelo de alcoholización y abstinencia *in vitro* en cultivos puros de neuronas corticales, en el que evaluamos el papel de los cannabinoides en la puesta en marcha de las neuroadaptaciones que aparecen durante el desarrollo de tolerancia al alcohol, así como el posible papel neuroprotector de estos compuestos en la situación de excitabilidad neuronal incrementada característica de la abstinencia alcohólica.

1. Efectos de la exposición aguda al alcohol sobre los niveles de endocannabinoides, expresión de FAAH y niveles del receptor CB₁

La importancia del estudio de los efectos del consumo agudo de alcohol sobre el sistema cannabinoide endógeno reside en la falta de estudios en la literatura científica que hayan evaluado esta fase de la alcoholización, es decir, durante los primeros contactos con esta sustancia. Hasta el momento, la mayoría de los análisis realizados se han llevado a cabo bajo patrones de administración de larga duración (Basavarajappa *et al.*, 1998; Basavarajappa y Hungund, 1999a; González *et al.*, 2002a; Ortiz *et al.*, 2004b; Vinod *et al.*, 2006); la mayoría de estos estudios han descrito un descenso en los niveles de receptor CB₁ y un incremento en el contenido de endocannabinoides bajo distintos protocolos de administración en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* que sugieren un estado general de hiperactividad del sistema cannabinoide endógeno tras exposiciones prolongadas al alcohol. En la presente tesis doctoral quisimos evaluar los efectos de la administración de alcohol a corto plazo sobre los niveles de endocannabinoides y de las llamadas “moléculas *entourag  *” (compuestos estructuralmente relacionados con la anandamida puesto que comparten con ella rutas de síntesis y de degradación, a las que se atribuyen acciones de tipo endocannabinoide *per se* pero sobretudo la capacidad de potenciar los efectos de los endocannabinoides gracias a que estas moléculas serían degradadas en lugar de los endocannabinoides, potenciando así la acción de éstos sobre sus receptores; para revisión ver Fowler, 2003), en concreto, las *N*-aciletanolaminas (NAEs) analizadas en nuestro estudio han sido: *N*-palmitoíletanolamina (PEA), *N*-linoleo  letanolamina (LEA), *N*-estearoíletanolamina (SEA), *N*-oleo  letanolamina (OEA).

Nuestros resultados muestran que la exposición al alcohol a corto plazo produce múltiples cambios (la mayor parte de ellos reducciones) en los niveles de endocannabinoides y de las NAEs en regiones cerebrales implicadas en el control de las emociones, la ingesta y el movimiento. Además, muestran que estos cambios son específicos de cada área particular del cerebro, lo que indica que cada compuesto varía siguiendo un patrón específico en cada región cerebral, aunque aparecen también algunas repuestas en común. Por otra parte, nuestros datos sugieren que los cambios inducidos por el alcohol afectan no solo los principales ligandos cannabinoide, AEA y 2-AG, sino también a todas las NAEs analizadas.

Los niveles de AEA en nuestro análisis descendieron significativamente en el hipotálamo, el caudado-putamen y la amígdala de los animales expuestos al alcohol, apareciendo la misma tendencia en la corteza prefrontal. Estos resultados concuerdan con un estudio *in vitro* de Basavarajappa y Hungund (1999b), que describió un decremento inicial de los niveles de AEA tras la exposición de células SK-N-SH al etanol durante 24 horas. De la

misma manera, nuestros resultados completan los de Ferrer *et al.* (2007), quienes han descrito una reducción en los niveles de AEA en áreas distintas a las estudiadas en nuestro trabajo (cerebelo, hipocampo y estriado ventral) tras una inyección i.p. de alcohol y a tiempos todavía más cortos que los empleados en nuestro trabajo (45-90 min). En este trabajo se describe también un descenso en los niveles de PEA, aunque no se analizaron los niveles de las otras NAEs medidas en nuestro estudio, ni del otro ligando endocannabinoide, el 2-AG.

Con respecto a los contenidos de 2-AG, éstos aparecen disminuidos en la corteza prefrontal de los animales a los que se administró alcohol. Este resultado contrasta con el incremento referido por Basavarajappa y Hungund (1999b) en neuronas granulosas cerebelares expuestas a alcohol durante 24-72h. Esta discrepancia podría indicar que los efectos de la exposición aguda al alcohol podrían variar entre distintas regiones cerebrales, es decir, diferentes neuronas en áreas cerebrales distintas podrían responder al alcohol de manera diferente o con un curso temporal distinto.

Como se ha mencionado, en el estudio de Ferrer *et al.* (2007), se ha descrito que los niveles de PEA se encontraban también reducidos tras la exposición aguda al alcohol. Nuestros resultados concuerdan con esas observaciones, pues hemos detectado un descenso generalizado de todas las etanolamidas de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, en la mayoría de las áreas examinadas. En particular, los niveles de PEA fueron significativamente menores en el caudado-putamen, mientras que los niveles de OEA aparecían reducidos en el caudado-putamen, la corteza prefrontal y el hipotálamo, y los de SEA en la amígdala, al comparar a los animales expuestos al alcohol con los controles. La única excepción fue la LEA, cuyos niveles aumentaron en la amígdala, pero en ninguna otra región estudiada en los animales expuestos al alcohol. Las diferentes familias químicas de NAEs comparten con la AEA mecanismos bioquímicos en su síntesis y degradación y, de forma menor, con el 2-AG (Sugiura *et al.*, 2006). Por tanto, es probable que los mecanismos por los cuales el alcohol induce un descenso en la AEA y en el resto de NAEs sean similares. Las causas de la reducción generalizada en los niveles de estas moléculas pueden deberse, por un lado, a una disminución en la síntesis que implicaría tanto a la enzima *N*-aciltransferasa (NAT) como a la fosfodiesterasa NAPE-PLD. Esta hipótesis fue considerada en el estudio de Ferrer *et al.* (2007), sin que se encontraran diferencias en los niveles de la enzima NAT. Por otro lado, otra posible explicación a los niveles reducidos de AEA y NAEs podría ser debido a una mayor degradación por la FAAH. Nuestros análisis parecen confirmar esta hipótesis en la mayoría de las áreas examinadas, puesto que los niveles FAAH se encuentran aumentados en la amígdala, la corteza prefrontal y el hipotálamo, aunque no en caudado-putamen. Estos resultados

muestran, por tanto, una correlación entre la disminución en los niveles de endocannabinoides y NAEs, y una mayor presencia de FAAH. En el estudio realizado por Ferrer *et al.* (2007), sin embargo, no se observaron cambios ni en los niveles de FAAH ni en los de las enzimas de síntesis de endocannabinoides. Estas discrepancias pueden ser debidas al diferente tiempo de exposición al alcohol (45-90 min. frente a 24h en nuestro caso), a la distinta vía de administración de alcohol (inyección intraperitoneal frente a vía oral) o a las áreas cerebrales analizadas en cada caso.

Otro aspecto a considerar en los efectos agudos del alcohol sobre la transmisión endocannabinóide es la posible implicación del glutamato en estos efectos. Una de las propiedades más conocidas del alcohol agudo es la inhibición de la transmisión excitatoria (Lovinger *et al.*, 1989; Hoffman *et al.*, 1989). Aunque los mecanismos moleculares que median este efecto no han sido del todo establecidos, existe consenso en admitir que tanto los receptores NMDA como no-NMDA (AMPA y kainato) son inhibidos por el etanol en varias regiones cerebrales, alterando de esta forma la conductancia de varios iones, incluyendo el calcio (para revisión ver Tsai y Coyle, 1998). Puesto que las enzimas que participan en la síntesis de NAEs (fosfolipasa D y *N*-aciltransferasa) requieren la presencia de calcio (Hansen *et al.*, 1997, 2002), y dado que el etanol reduce la liberación de glutamato y consecuentemente la entrada de calcio en la célula (Tsai y Coyle, 1998), se podría hipotetizar que la reducción general en los niveles de endocannabinoides y otras NAEs podría deberse a la acción del etanol sobre el sistema glutamatérgico. Esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados mostrados por Ferrer *et al.* (2007), donde se observó que el descenso en los niveles de AEA y PEA tras la exposición aguda al alcohol estaba acompañado por una disminución en la liberación de glutamato. Este efecto se produjo en diferentes regiones, a pesar de la ausencia de cambios en las enzimas implicadas en la síntesis de NAEs. Un mecanismo similar podría estar también implicado aquí, aunque harían falta otros análisis para poder confirmar esta hipótesis. Es interesante remarcar que este mecanismo podría llevar a una tolerancia cuando la exposición al alcohol se vuelve regular, pues resultaría en una elevación de la señalización glutamatérgica y a una producción incrementada de endocannabinoides, como ha sido descrito anteriormente (para revisión ver Colombo *et al.*, 2005; Hungund y Basavarajappa, 2000; Hungund *et al.*, 2002).

Otra de las preguntas que se plantearon en este objetivo fue la posible variación en los niveles del receptor CB₁ que podría acompañar los cambios en el contenido de endocannabinoides y FAAH. Los resultados encontrados muestran que, tras 24 horas de exposición al alcohol, y en paralelo al aumento en los niveles de FAAH, se produce un

descenso en los niveles de este receptor en la amígdala y la corteza prefrontal, lo que agravaría la pérdida de actividad endocannabinoide en esta circunstancia. La disminución hallada en la amígdala coincide con lo referido por Oliva *et al.* (2007), quienes observaron un descenso en los niveles de expresión del receptor CB₁ tras una exposición aguda al alcohol. Sin embargo, en este estudio se describen también menores niveles de expresión del receptor CB₁ en caudado-putamen y núcleo hipotalámico ventral, aunque hay que tener en cuenta, por un lado y una vez más, los distintos patrones de administración de alcohol en cada estudio, y, por otro lado, que nuestro análisis estaba dirigido a cuantificar niveles de proteína mediante *western blot*, mientras que en el publicado por Oliva *et al.* (2007) se determinó el nivel de expresión génica por hibridación *in situ*.

2. Estudio de los efectos del alcohol tras dos tipos de patrones de administración: consumo crónico ininterrumpido o consumo intermitente, sobre los niveles de expresión del receptor CB₁ y la enzima FAAH

Otra de las aproximaciones al estudio de los efectos del consumo de alcohol sobre el sistema endocannabinoide ha sido analizar los efectos de la administración crónica de alcohol bajo dos patrones diferentes de administración: la exposición ininterrumpida y la exposición en ciclos sucesivos de alcoholizaciones y abstinencias. En ambos casos, se han estudiado los efectos sobre los niveles de expresión del receptor CB₁ y la enzima FAAH, en varias áreas del cerebro implicadas en el circuito de recompensa cerebral (amígdala, bulbo olfatorio y corteza prefrontal). El interés de este tipo de estudio radica en la descripción en la literatura de efectos diferentes cuando la administración crónica de alcohol se realiza bajo los dos tipos de administración, en varios de los sistemas de neurotransmisión que han sido más implicados en el desarrollo de tolerancia al alcohol, como son los sistemas GABAérgico, glutamatérgico y dopaminérgico (Hu y Ticku, 1997; Becker *et al.*, 1998; Dahchour y De Witte, 2003; Diana *et al.*, 2003; Sheela Rani y Ticku, 2006), como se comentará más adelante. Además, este tipo de estrategia tiene interés para aspectos relacionados con la neurotoxicidad de la abstinencia alcohólica que se estudiarán en el objetivo 5 de esta tesis doctoral.

El comportamiento adictivo asociado con el alcoholismo es un trastorno recidivante y crónico, que lleva asociado una vulnerabilidad crónica a la recaída tras el cese del consumo de alcohol. En humanos, la adicción al alcohol se presenta con ciclos de intoxicación intensa con etanol, alternos con periodos de abstinencia. Este tipo de consumo provoca repetidos síndromes de abstinencia, cuya severidad está relacionada de forma directa con el número de ciclos de intoxicación y abstinencia sufridos (Brown *et al.*, 1988; Booth y Blow, 1993; Becker ,

1998; De Witte *et al.*, 2003). Los estudios en animales de laboratorio apoyan estos datos (McCown y Breese, 1990; Becker y Hale, 1993; Kokka *et al.*, 1993; Veatch y Gonzalez, 1996), y han puesto de manifiesto la importancia de un patrón de administración intermitente en la inducción de alteraciones a largo plazo en la función de receptores profundamente implicados en la adicción al alcohol, como son los receptores GABA_A y NMDA (Hu y Ticku, 1997; Becker *et al.*, 1998). Así, se ha descrito que un patrón intermitente de administración de alcohol tiene efectos menos pronunciados sobre la expresión del receptor GABA_A, pero aumenta los niveles de expresión de la subunidad NR2B del receptor NMDA de forma más dramática que una exposición crónica en cultivos de neuronas corticales (Sheela Rani y Ticku, 2006). También el aumento de los niveles extracelulares de glutamato inducidos por la abstinencia están relacionados de forma directa con el número de abstinencias (Dahchour y De Witte, 2003). Por otra parte, se ha propuesto que un patrón intermitente de administración de etanol podría causar un aumento en las propiedades reforzantes del alcohol, como sugiere el hecho de que el etanol tenga un mayor efecto sobre las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral tras su administración intermitente (Diana *et al.*, 2003). De acuerdo con estos resultados, otros estudios han mostrado que los tratamientos repetidos con etanol y las sucesivas abstinencias conducen a mayores ingestas de etanol y a un mayor grado de preferencia que el consumo crónico ininterrumpido (Rimondini *et al.*, 2003; O'Dell *et al.*, 2004). Hasta el momento solo ha sido publicado un único estudio en el que se evalúen los efectos de un patrón de administración intermitente sobre la actividad del sistema endocannabinoide (Mitrirattanakul *et al.*, 2007). En este estudio, llevado a cabo en el hipocampo de ratas, se observaron cambios tras la abstinencia a largo plazo en los receptores CB₁ y los niveles de endocannabinoides que fueron relacionados con las discapacidades cognitivas que aparecen tras el consumo intermitente de alcohol a largo plazo (Mitrirattanakul *et al.*, 2007).

Por otra parte, a pesar de los numerosos estudios publicados acerca de los efectos del consumo crónico de alcohol sobre los receptores CB₁ o los niveles de endocannabinoides, por el momento no hay ningún estudio que haya analizado el efecto del consumo crónico de alcohol (ya sea de forma ininterrumpida o en ciclos de alcohol y abstinencias repetidas) sobre la enzima de degradación de anandamida y otras NAEs (FAAH). Se ha descrito que esta enzima está implicada en la adicción al alcohol, puesto que la administración del inhibidor de FAAH URB597 aumenta tanto la preferencia (Blednov *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2008) como la autoadministración de alcohol (Hansson *et al.*, 2007). Además, los estudios con animales *knock-out* para la FAAH sugieren que esta enzima participa principalmente en las etapas de consumo

de alcohol (Sipe *et al.*, 2002; Basavarajappa *et al.*, 2006; Blednov *et al.*, 2007), pero no parece que ejerza una influencia importante durante la fase de abstinencia (Blednov *et al.*, 2007; aunque ver también Vinod *et al.*, 2008).

En este estudio se han analizado las posibles modificaciones del receptor CB₁ y la FAAH en áreas cerebrales importantes en los procesos de refuerzo y la adicción a drogas de abuso como son la corteza prefrontal y la amígdala (González *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). Además hemos querido evaluar los efectos de la administración crónica ininterrumpida y en ciclos de alcoholizaciones y abstinencias sucesivas en el bulbo olfatorio, ya que esta última región pertenece al sistema corticolímbico, participa también en el aprendizaje y la memoria (Amemori *et al.*, 1989; Van Rijzingen *et al.*, 1995) y constituye una de las áreas más sensibles a la neurodegeneración inducida por el alcohol incluso tras periodos de administración cortos (Obernier *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran variaciones en los niveles de CB₁ y FAAH tras el consumo crónico de alcohol que podrían indicar neuroadaptaciones encaminadas a tratar de contrarrestar los efectos de la presencia crónica de alcohol sobre los niveles de endocannabinoides. Estos cambios son dependientes de la región cerebral analizada, ya que mientras que en la corteza prefrontal no hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de CB₁ ni FAAH tras el tratamiento crónico con alcohol, en la amígdala hemos encontrado un aumento en los niveles de ambas proteínas. El incremento en los niveles de FAAH significaría la posibilidad de una mayor degradación de los endocannabinoides, es decir, los niveles de endocannabinoides se encontrarían disminuidos en esta situación, por lo que el cerebro trataría de contrarrestar este descenso aumentando la expresión del receptor CB₁ en esta área (es decir, se trataría de una situación de hipoactividad endocannabinoide). Por el contrario, en el bulbo olfatorio hemos detectado menores niveles de FAAH y CB₁ tras el consumo crónico de alcohol; el descenso en los contenidos de FAAH correspondería con un aumento en el nivel de endocannabinoides, que a su vez provocaría el descenso en la expresión del receptor CB₁ para tratar de compensar el aumento de tono endocannabinoide (en este caso se trataría por tanto de una situación de hiperactividad del sistema cannabinoide).

La presencia continuada del alcohol en el cerebro conduce a cambios en muchos -si no todos- los sistemas de neurotransmisión cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998). La pérdida de la homeostasis debida a la presencia prolongada del etanol sería subsanada con el desarrollo de cambios en los sistemas de neurotransmisión alterados -GABA, glutamato, dopamina, serotonina, así como neuropéptidos (excelentes revisiones en Koob y Le Moal, 2001 y De

Witte, 2004). A su vez, estos cambios conducirían a una nueva situación de equilibrio dentro de la alteración general por la presencia del alcohol (en este caso, aunque se ha sugerido que este principio sea común a todas las adicciones) en el cerebro a la que algunos autores han denominado “alostasis” (Sterling y Eyer, 1988; Koob y Le Moal, 2001). Los cambios compensatorios inducidos en los niveles del receptor CB₁ y de la enzima FAAH tras la administración crónica de alcohol que hemos encontrado en este estudio concuerdan con la hipótesis del desarrollo de un nuevo equilibrio homeostático en el cerebro encaminado a contrarrestar los cambios provocados por la presencia continua del alcohol.

El aumento encontrado en la amígdala y la ausencia de cambios en la corteza prefrontal en los niveles del receptor CB₁ concuerda con la ausencia de cambios tras la administración crónica de alcohol descrita por González *et al.* (2002), pero contrasta con el descenso descrito por otros autores empleando también un patrón de administración crónica de alcohol (Basavarajappa *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2004). Con respecto al estudio llevado a cabo por Basavarajappa *et al.* (1999), las diferencias pueden ser debidas al tipo de análisis realizado, ya que en su caso emplearon membranas plasmáticas sinápticas de ratones a los que se había expuesto durante 4 días al alcohol, por lo que sería difícil una comparación directa con nuestro estudio. En el caso del trabajo de Ortiz *et al.* (2004), ninguna de las áreas analizadas en su estudio (caudado-putamen, núcleo hipotalámico ventromedial, giro dentado y áreas CA1 y CA2 del hipotálamo) corresponde con las estudiadas en nuestro caso. Además, en su estudio se describe un descenso en todas las áreas analizadas excepto el giro dentado, donde se produce un importante aumento en los niveles de expresión del receptor CB₁, aunque los autores no discuten las posibles causas de estas discrepancias.

Se ha propuesto que la hiperactividad endocannabinoide encontrada en otros estudios (Basavarajappa *et al.*, 1999; Ortiz *et al.*, 2004) tras periodos de administración crónica de alcohol podría resultar un mecanismo de defensa del cerebro frente al daño que supone la presencia permanente del alcohol. Nuestros resultados pondrían de manifiesto la dependencia de los efectos de la administración crónica de alcohol en función del área cerebral en la que nos centremos, y se podría hipotetizar que las neuroadaptaciones que el cerebro pone en marcha para contrarrestar el daño que supone la presencia constante del alcohol serían dependientes de cada región cerebral particular, de forma que en un área la respuesta podría ser una hiperactividad del sistema endocannabinoide (en nuestro estudio, el bulbo olfatorio), mientras que en otra podría ser un descenso de su actividad (en nuestro estudio, la amígdala). La respuesta de hiperactividad o de descenso de actividad del sistema estaría determinada por el tono neuroquímico general de cada región en particular, a través de un mecanismo análogo

al que se ha propuesto en el caso de las aferencias que llegan al área tegmental ventral (Riegel y Lupica, 2004; Maldonado *et al.*, 2006). Puesto que los cannabinoides son moduladores capaces de inhibir la liberación de neurotransmisores desde la neurona presináptica (Alger, 2002; Wilson y Nicoll, 2002), y que en cada área cerebral la presencia del alcohol crónico podría desregular el tono neuroquímico general de esa área de forma independiente en función del tipo neuronal aferente mayoritario, tendría sentido pensar que la respuesta del sistema endocannabinoide será específica en función del tipo neuronal mayoritario en esa área, para así compensar en cada caso las respuestas funcionales de áreas particulares. Así por ejemplo, en áreas donde las aferencias mayoritarias fueran glutamatérgicas, la hiperactividad del sistema endocannabinoide provocaría la inhibición de la estimulación producida por estas aferencias, y en consecuencia una menor actividad de las neuronas cuyos somas se encuentren en esta área (GABAérgicas, dopaminérgicas...).

Además de los efectos de la administración crónica de alcohol, en nuestro estudio también quisimos evaluar los efectos sobre la expresión de FAAH y CB₁ de la abstinencia tras la exposición intermitente al alcohol. El interés del tipo de administración de alcohol (crónico o intermitente) radica en la existencia de efectos diferentes sobre diversos sistemas de neurotransmisión implicados de forma importante en la adicción al alcohol dependiendo del tipo de administración de esta sustancia. Así, se han descrito cambios en la expresión, conformación y/o funcionalidad de dos de los receptores que han sido más íntimamente relacionados tanto con los efectos agudos del alcohol como con el desarrollo de tolerancia y dependencia, es decir, en los receptores GABA_A y NMDA, en función del tipo de exposición a esta sustancia (Sheela Rani y Ticku, 2006); también se produce un aumento mayor en la liberación de glutamato tras varios ciclos de alcoholización y abstinencia que tras la exposición ininterrumpida al alcohol (Dahchour y De Witte, 2003). Por último, también se han descrito variaciones en el sistema dopaminérgico del circuito de recompensa que difieren en función del tipo de exposición al alcohol (Diana *et al.*, 2003; Rimondini *et al.*, 2003; O'Dell *et al.*, 2004) y que sugieren que la administración en ciclos de alcoholización y abstinencia conduciría al desarrollo de una cierta sensibilidad a los efectos reforzantes al alcohol (Diana *et al.*, 2003). Por otra parte, una parte importante de la población consume alcohol según un patrón intermitente de alcoholizaciones y abstinencias a lo largo del tiempo, por lo que este patrón de administración en animales de laboratorio parece reflejar mejor el tipo de consumo que se da en los humanos y ha de ser analizado con más profundidad.

Con respecto a los niveles de FAAH encontrados en el grupo de animales abstinentes tras la exposición intermitente al alcohol, en nuestro estudio no hemos detectado diferencias

en ninguna de las áreas analizadas. Esta falta de variaciones en la expresión de esta enzima durante la fase de abstinencia concuerda con la hipótesis que propone que la FAAH no estaría implicada de forma decisiva en esta etapa de la adicción al alcohol (al contrario de lo que parece pasar con la situación de exposición aguda al alcohol). Hay estudios que muestran que esta enzima ejerce una influencia importante durante la fase de consumo de alcohol (Sipe *et al.*, 2002; Basavarajappa *et al.*, 2006; Blednov *et al.*, 2007), pero estudios con animales *knock-out* para la FAAH sugieren que el papel de esta enzima en la etapa de abstinencia no es determinante (Blednov *et al.*, 2007; aunque ver también Vinod *et al.*, 2008).

En cuanto a la expresión de receptores CB₁, los resultados publicados hasta el momento en la situación de abstinencia difieren en función del tipo de administración de alcohol. En un protocolo de administración de alcohol crónico (72 horas) seguido de 24 horas de abstinencia, Vinod *et al.* han descrito la recuperación de los niveles del receptor CB₁ hasta los niveles controles (Vinod *et al.*, 2006). Sin embargo, Mitrirattanakul *et al.*, siguiendo un protocolo de administración intermitente de alcohol, han mostrado un descenso inicial en los niveles del receptor CB₁ tras 2 días de abstinencia, y posteriormente un incremento a largo plazo (40 días) (Mitrirattanakul *et al.*, 2007). Los resultados de expresión del receptor CB₁ en el grupo de abstinencia de nuestro estudio muestran un aumento significativo frente a los grupos control y crónico en la corteza prefrontal, sin que aparezcan cambios en bulbo olfatorio ni amígdala. La razón de las discrepancias entre los resultados referidos por Mitrirattanakul *et al.* (2007) y nuestros resultados puede deberse, una vez más, al empleo de diferentes áreas cerebrales, puesto que los análisis de Mitrirattanakul *et al.* (2007) fueron realizados únicamente en el hipocampo. Por otra parte, esta ausencia de cambios podría también deberse a una corrección en los niveles de expresión de CB₁ y FAAH tras la retirada del alcohol durante 24 horas, aunque en el estudio de Mitrirattanakul *et al.*, 2007 se encontraron variaciones en los niveles del receptor CB₁ a corto (2 días) y largo (40 días) plazo tras la retirada del alcohol.

Por otro lado, se podría hipotetizar que la ausencia de cambios podría deberse precisamente a la alternancia entre periodos de alcoholización y periodos de abstinencia, que no permitiría el desarrollo de adaptaciones sostenidas en el cerebro. Puesto que el sistema endocannabinoide juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, y que durante la exposición crónica al alcohol se ponen en marcha toda una serie de adaptaciones encaminadas al desarrollo de una nueva situación de equilibrio en el cerebro (excelentes revisiones en Koob y Le Moal, 2001; Le Moal y Koob, 2007), la ausencia de cambios en este sistema en el último periodo de abstinencia tras varios ciclos de alcoholización podría ser interpretada como uno de los factores que influyen en la expresión diferente de los

cambios en los sistemas GABAérgico, glutamatérgico y dopaminérgico encontrados al comparar los modelos de alcoholización crónica *versus* intermitente (Hu y Ticku, 1997; Becker *et al.*, 1998; Diana *et al.*, 2003). Es decir, la “no-adaptación” del sistema endocannabinoide podría participar en el agravamiento de los cambios que se produce tras los ciclos alternos de alcoholización y abstinencia descritos por otros autores. Este hecho pondría de manifiesto la importancia del sistema endocannabinoide a la hora de restablecer de nuevo el equilibrio cuando el alcohol está presente de forma crónica en el cerebro. Sin embargo, sería necesario realizar más experimentos para apoyar esta hipótesis.

Los resultados encontrados en nuestro estudio aportan nuevos datos acerca del efecto del consumo crónico de alcohol sobre el sistema endocannabinoide, en particular sobre los niveles de expresión del receptor CB₁ y, por primera vez en la literatura, también de la enzima FAAH. Hemos encontrado cambios en el sistema endocannabinoide en el bulbo olfatorio que podrían sugerir la hiperactividad del sistema, y por el contrario un descenso de la actividad de este sistema en la amígdala, sin que aparezcan cambios en la corteza prefrontal. Estas variaciones en cuanto a la actividad del sistema han sido discutidas en términos de la especificidad de los cambios en el sistema endocannabinoide en función de cada área cerebral particular. Por otra parte, hemos analizado los cambios en los niveles de CB₁ y FAAH en animales abstinentes expuestos a varios ciclos de alcoholización y abstinencia. No hemos detectado variaciones en los niveles de FAAH, lo que apoyaría la hipótesis de que esta enzima no está implicada de forma determinante en los procesos de abstinencia alcohólica. Por su parte, los animales abstinentes muestran un incremento en los niveles de CB₁ en la corteza prefrontal, sin que aparezcan modificaciones en amígdala ni bulbo olfatorio. Esta ausencia de cambios podría reflejar la particularidad de cada región cerebral en cuanto a la manifestación de los cambios en los receptores CB₁, y podría remarcar la importancia del sistema endocannabinoide en la puesta en marcha de las adaptaciones del cerebro a la presencia continuada del alcohol.

3. Evaluación del grado de afectación de ciertos elementos del sistema endocannabinoide en poblaciones de sujetos alcohólicos y no alcohólicos.

A pesar del elevado número de datos publicados sobre las relaciones entre el sistema endocannabinoide y el alcoholismo en animales de laboratorio, hay muy pocos análisis que hayan sido llevados a cabo en alcohólicos humanos. Obviamente el interés de estos estudios radica en la ampliación, desde la extensa investigación preclínica ya realizada hasta la clínica, de los datos que implican al sistema endocannabinoide en la adicción al alcohol, y que permitirían

desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología. Por este motivo, otro de los objetivos de la presente tesis doctoral ha sido reproducir, en la medida de lo posible, los análisis de elementos concretos del sistema endocannabinoide en el cerebro de pacientes alcohólicos, ya que la gran mayoría de los estudios realizados en este campo lo han sido en animales de laboratorio. En nuestro trabajo hemos comparado la densidad y la afinidad de los receptores CB₁, así como los niveles de la enzima FAAH en diversas áreas cerebrales de sujetos alcohólicos o controles víctimas de suicidio o fallecidos por causas naturales. Se han elegido cuatro áreas cerebrales para la realización de los análisis: (i) la corteza cerebral, ya que está implicada de forma importante en la autorregulación del comportamiento y su patología en los problemas de autocontrol (Arnsten y Li, 2005; Dalley *et al.*, 2004; Miller y Cohen, 2001), así como en la emoción y la valoración de los estímulos ambientales externos (Cardinal *et al.*, 2002); (ii) el núcleo caudado, que ha sido implicado tanto en la actividad locomotora como en la respuesta comportamental emocional durante el síndrome de abstinencia a drogas de abuso (Oliva *et al.*, 2003); (iii) el hipocampo, área que participa de forma importante en los procesos de memoria y aprendizaje, incluido el aprendizaje que aparece durante los procesos adictivos (Morris *et al.*, 1982; Robbins *et al.*, 2002; del Olmo *et al.*, 2006) y que forma además parte del sistema corticolímbico, que conecta diversas áreas corticales con el bulbo olfatorio y el hipocampo (Obernier *et al.*, 2002b). Por último, hemos querido también analizar los posibles cambios que aparecen en el cerebelo, un área que ha sido más implicada en el comportamiento motor que en las adicciones, de forma que se puede considerar como un área “control”.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que en la corteza cerebral de los sujetos del grupo “muerte natural” no existen diferencias en cuanto a los niveles o la afinidad de los receptores CB₁. Sin embargo, entre los sujetos suicidas sí que aparecen diferencias en estos parámetros. En concreto, hemos observado un aumento en la densidad de receptores CB₁ en los sujetos alcohólicos suicidas al compararlos frente al grupo control-suicidio. Sin embargo, los valores de K_d obtenidos en este grupo muestran que estos receptores presentan menor afinidad por su ligando ([³H]-WIN 55,212-2) al compararlos con el grupo control-suicidio. Con respecto a los niveles de la enzima FAAH, hemos observado una menor expresión de esta enzima en el grupo alcoholismo-suicidio respecto al control-suicidio. Menores niveles de FAAH significarían menores tasas de degradación de endocannabinoides, que podría corresponder a un mayor contenido en estos compuestos, por lo que se podría pensar que el descenso encontrado en la afinidad de los receptores CB₁ en el grupo alcoholismo-suicidio frente al control-suicidio podría representar la respuesta adaptativa

cerebral al mayor contenido en endocannabinoides, para evitar la sobreestimulación de los receptores cannabinoides. Estos hallazgos coinciden, en su mayoría, con los resultados descritos por Vinod *et al.* (2005), quienes observaron un incremento tanto en la densidad como en la funcionalidad de los receptores CB₁ (aunque no vieron diferencias en la afinidad de estos receptores), así como mayores niveles de endocannabinoides en la corteza cerebral de sujetos alcohólicos víctimas de suicidio, al compararlos con sujetos alcohólicos cuya muerte ocurrió por causas naturales. En este artículo, los autores proponían que la hiperactividad endocannabinoide encontrada en los alcohólicos suicidas podría ser un factor potencial de riesgo de suicidio en la situación de alcoholismo (Vinod *et al.*, 2005); en este análisis no se incluyeron, sin embargo, muestras pertenecientes a sujetos no alcohólicos cuya muerte fuera debida a causas naturales o a suicidio. En nuestro estudio hemos querido controlar estas variables mediante la inclusión en el análisis de muestras de controles tanto fallecidos por causas naturales como víctimas de suicidio.

Con respecto a los hallazgos encontrados en el núcleo caudado, se ha observado una disminución significativa en la densidad de los receptores CB₁ en el caso de suicidio frente a la de muerte natural, independientemente del factor alcoholismo; es decir, los sujetos suicidas, tanto alcohólicos como controles, muestran menores niveles de receptores CB₁ que los sujetos cuya muerte ocurrió por causas naturales. Este descenso está compensado, en el grupo control-suicidio, por un incremento en la afinidad de estos receptores. Sin embargo, al observar los resultados de los sujetos alcohólicos suicidas en este núcleo, observamos un descenso en la afinidad de los receptores CB₁ al compararlos con los controles-suicidas, sin que haya modificaciones en cuanto a densidad de receptores. En esta área además hemos observado un aumento en los niveles de FAAH en todos los grupos al compararlos con el grupo control-muerte natural.

El perfil de cambios encontrados en el hipocampo se asemeja parcialmente a los observados en la corteza cerebral y en el hipocampo. En cuanto a los niveles de expresión del receptor CB₁, no hemos detectado variaciones entre sujetos pertenecientes al grupo “muerte natural”, independientemente de que fueran alcohólicos o no alcohólicos. Por el contrario, dentro del grupo suicidio hemos observado un incremento en la densidad de estos receptores en el grupo alcoholismo-suicidio comparado con el grupo control-suicidio. Al igual que lo que ocurre en la corteza cerebral, este aumento en la densidad de receptores CB₁ en los alcohólicos suicidas está compensado por un descenso significativo en la afinidad de los receptores, al compararlos tanto con los controles suicidas como con los alcohólicos cuya muerte fue debida a causas naturales; sin embargo, puesto que no hemos detectado cambios en la expresión de la

enzima FAAH en esta región, la hipótesis de que los cambios en la densidad y afinidad de CB₁ se produzcan como consecuencia de las variaciones en los niveles de FAAH y, como consecuencia, a través de cambios en el contenido de endocannabinoides, no sería válida en este caso, y quizá responderían más bien a cambios en la síntesis de estos compuestos, o a una inhibición del transporte desde la brecha sináptica, como ha sido sugerido por otros autores (Basavarajappa *et al.*, 2003) por lo que sería necesario realizar más experimentos para poder responder a esta cuestión.

Por último, los resultados obtenidos en el cerebelo muestran una completa ausencia de variaciones en cuanto a la densidad de receptores CB₁ en los diferentes grupos experimentales, y únicamente un descenso (aunque no significativo) en la afinidad de estos receptores en el grupo de alcohólicos víctimas de suicidio, lo que correspondería con la idea de que esta región tendría un papel menos importante de esta área en los procesos adictivos en general y en la adicción al alcohol en particular.

Es posible que las causas de las variaciones encontradas en la afinidad y la densidad de los receptores sean directas y se produzcan a través de cambios en el estado de fosforilación/desfosforilación, cambios en la expresión del receptor; pero también podrían ser debidas a mecanismos indirectos, y ser consecuencia de una menor tasa de síntesis de endocannabinoides, o a una mayor degradación de estas moléculas por parte de la FAAH. En nuestro estudio únicamente hemos podido evaluar esta última posibilidad, y un hallazgo importante de nuestro estudio ha sido el aumento en los niveles de expresión de la enzima FAAH en los sujetos suicidas no alcohólicos frente a los sujetos no alcohólicos cuya muerte fue debida a causas naturales en todas las áreas analizadas excepto el hipocampo. Mayores niveles de FAAH podrían corresponder a un menor contenido en endocannabinoides en estas áreas cerebrales. Puesto que bajos niveles de endocannabinoides han sido relacionados con estados de ansiedad aumentada, hiperactividad e hiperlocomoción en animales de laboratorio (Fernández-Ruiz *et al.*, 2003), se podría pensar que podría haber una correlación entre bajos niveles de endocannabinoides y el comportamiento suicida. En un estudio llevado a cabo con muestras pertenecientes a víctimas de suicidas con depresión mayor, comparadas con muestras de sujetos no deprimidos que murieron por causas naturales, se describió un aumento en los niveles y la funcionalidad de los receptores CB₁ en los suicidas con depresión (Hungund *et al.*, 2004); sin embargo, con la comparación entre estos dos grupos no se puede discriminar si las variaciones encontradas eran debidas a la condición de depresión o al comportamiento suicida.

El conjunto de resultados mostrados apoya los datos obtenidos en animales de laboratorio que implican de forma sustancial al sistema endocannabinóide en los procesos

adictivos en general, y en el alcoholismo en particular. Además, extienden estas evidencias desde el caso de los animales de laboratorio hasta los pacientes humanos, lo que posiblemente permitirá ampliar el espectro de dianas terapéuticas e incluir entre ellas a diferentes elementos del sistema cannabinoide endógeno en el tratamiento del alcoholismo.

4. Evaluación del posible efecto beneficioso del antagonista CB₁ rimonabant sobre la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica temprana, y análisis de los mecanismos neuroquímicos implicados en este efecto.

En los últimos años han sido publicados numerosos estudios que implican al receptor cannabinoide CB₁ en los circuitos neurales que participan en el control del consumo de alcohol y la motivación para conseguir esta droga. Por ejemplo, se ha demostrado que los agonistas y los antagonistas de este receptor son capaces de estimular e inhibir, respectivamente, la ingesta de alcohol, su autoadministración, y las propiedades motivacionales que el alcohol presenta tanto en ratas como en ratones. Por otra parte, también se ha descrito que los ratones deficientes para el receptor CB₁ no presentan signos del síndrome de abstinencia (Racz *et al.*, 2003), lo que sugiere que el bloqueo farmacológico de estos receptores podría ser eficaz no solo frente a la etapa de consumo de alcohol, sino también durante la fase de abstinencia. Esto indica que el sistema endocannabinoide probablemente juegue un papel importante en la manifestación de los síntomas físicos de la dependencia a drogas de abuso en general, no sólo al alcohol, puesto que también se ha descrito una reducción significativa de los síntomas del síndrome de abstinencia en ratones *knockout* para CB₁ durante la interrupción del consumo de morfina (Ledent *et al.*, 1999). Por este motivo, otro de los objetivos de esta tesis doctoral fue evaluar el posible papel beneficioso del antagonista CB₁ rimonabant sobre los signos comportamentales desencadenados durante la abstinencia al alcohol, y tratar de establecer los posibles mecanismos neuroquímicos a través de los cuales se produce esta mejoría.

Para ello, en primer lugar desarrollamos un modelo de abstinencia temprana al alcohol, mediante la exposición forzada de los animales al alcohol en el agua de bebida durante un periodo de 10 días, tras los cuales se interrumpió el consumo para inducir la abstinencia. Tres horas después, se realizaron pruebas comportamentales tanto en el actímetro –para examinar la actividad locomotora general de los animales- como en el laberinto en cruz elevado –para analizar su estado de ansiedad- con el fin de comprobar la posible existencia a nivel comportamental de manifestaciones o signos de abstinencia al alcohol. En estos experimentos preliminares se observó un incremento en el comportamiento de tipo ansiogénico en los

animales abstinentes, así como una marcada hiperlocomoción que desaparecía a medida que aumentaba el tiempo desde el inicio de la abstinencia.

Una vez establecida la presencia de signos comportamentales del síndrome de abstinencia a alcohol a este tiempo de interrupción del consumo de alcohol, el objetivo de nuestro estudio fue evaluar el posible efecto beneficioso del bloqueo del receptor CB₁ con rimonabant sobre la intensidad de la abstinencia al alcohol, y descubrir cuales podrían ser los mecanismos a nivel molecular que se encuentran implicados en este efecto.

Los resultados que se han obtenido tras el bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ en la abstinencia alcohólica muestran un efecto ansiolítico ligado específicamente a la situación de abstinencia, puesto que no hay efectos sobre los animales control. Estos resultados coinciden con los obtenidos tras la delección de los receptores CB₁ publicados por Racz *et al.* (2003) y mencionados anteriormente, en los que se observó que los ratones *knockout* para el receptor CB₁ no mostraban síntomas de abstinencia tras la exposición crónica al alcohol y posterior interrupción del consumo.

Una vez establecido que el rimonabant provocaba una mejoría en la ansiedad inducida por la abstinencia al alcohol, nos propusimos estudiar los mecanismos que subyacen a esta mejora. Los signos comportamentales de la abstinencia al alcohol se producen como consecuencia de los reajustes en los procesos neuroadaptativos provocados por la exposición prolongada al alcohol (De Witte *et al.*, 2003; Cowen y Lawrence, 2006). Estos procesos homeostáticos implican múltiples sistemas de neurotransmisión y neuromodulación en diversas áreas cerebrales. En nuestro estudio, las áreas elegidas para analizar han sido, por una parte, aquellas implicadas en el circuito de recompensa cerebral, como es el caso de la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el área tegmental ventral y la amígdala (González *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). La corteza prefrontal participa además en el control del movimiento voluntario y en la reacción ante determinados estímulos. El hipotálamo (principalmente ciertos núcleos como el núcleo ventromedial) ha sido implicado en los aspectos apetitivos de la ingesta, tanto de comida como de bebida (Ortiz *et al.*, 2004). Además, se han elegido otras áreas, involucradas en la actividad motora del animal, como el globo pálido, la sustancia nigra y el caudado-putamen; ésta última es un área que ha sido implicada tanto en la actividad locomotora como en la respuesta comportamental emocional durante el síndrome de abstinencia a drogas de abuso (Oliva *et al.*, 2003).

En general, las alteraciones neuroquímicas que se han observado concuerdan con las teorías que sostienen la puesta en marcha de procesos neuroadaptativos inducidos por la presencia prolongada del alcohol. Estas teorías además mantienen que los sustratos

neuroquímicos que son activados por la presencia aguda del alcohol sufren cambios compensatorios durante la exposición crónica al alcohol, y que estos cambios serían los responsables de la aparición de los síntomas característicos del síndrome de abstinencia en sujetos dependientes del alcohol (para revisión, ver Fadda y Rossetti, 1998; Weiss y Porrino, 2002; De Witte *et al.*, 2003; Cowen y Lawrence, 2006).

La abstinencia al alcohol está caracterizada por un estado de mayor ansiedad e hiperexcitabilidad que se corresponde, a nivel neuroquímico, con una desregulación de los sistemas excitatorio e inhibitorio del cerebro, es decir, de los sistemas glutamatérgico y GABAérgico, respectivamente (De Witte, 2004). De forma aguda, el etanol aumenta la neurotransmisión GABAérgica a través de diversos mecanismos (Chandler *et al.*, 1998); la abstinencia al alcohol origina el efecto opuesto, es decir, una disminución de la transmisión GABAérgica, que se corresponde con los resultados encontrados en algunas de las áreas examinadas en nuestro estudio. En particular, hemos encontrado que, durante la abstinencia tras el consumo prolongado de alcohol, los niveles de GABA disminuyen en la corteza prefrontal, el caudado-putamen, el globo pálido y la amígdala.

Por el contrario, la exposición aguda al alcohol se asocia con una disminución en la transmisión glutamatérgica, mientras que la abstinencia provoca una mayor liberación de glutamato que además está acompañada por un aumento en la sensibilidad a este neurotransmisor en diversas áreas cerebrales (Tsai y Coyle, 1998; De Witte *et al.*, 2003). En nuestro experimento, los niveles de glutamato en el caudado-putamen aumentaron drásticamente al inducir la abstinencia a los animales, coincidiendo con la desregulación excitatoria típica de la situación de abstinencia (De Witte *et al.*, 2003).

Por tanto, esta inhibición del sistema GABAérgico, junto con la mayor actividad del sistema glutamatérgico durante la abstinencia al alcohol coincide con el estado de sobreexcitación y la alteración del balance entre estos dos sistemas de neurotransmisión descrito por De Witte *et al.* (2003) tras el cese del consumo de alcohol.

Los datos acerca del papel beneficioso del rimonabant a nivel de comportamiento se apoyan en los resultados obtenidos a nivel neuroquímico, ya que la administración de rimonabant fue capaz de atenuar algunos de los cambios encontrados en los animales abstinentes. En la corteza prefrontal y los ganglios basales la disminución en los niveles de GABA es mitigada por la administración de este antagonista; además, el aumento encontrado en los niveles de glutamato fue parcialmente corregido por la administración de rimonabant. La corrección parcial de los niveles de GABA y glutamato en estas áreas cerebrales podría ser responsable, al menos en parte, del efecto de tipo ansiolítico del fármaco.

Se ha descrito que el etanol, administrado de forma aguda, es capaz de estimular la liberación de serotonina en el núcleo accumbens, la corteza frontal, y el hipocampo ventral (Thielen *et al.*, 2001). Por el contrario, la abstinencia provoca una deficiencia en la liberación de este neurotransmisor que ha sido relacionada con las consecuencias afectivas negativas de la abstinencia al alcohol (De Witte *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio no se han encontrado diferencias en los niveles de serotonina en estas áreas cerebrales; solamente se ha observado un marcado aumento del contenido de este neurotransmisor en el hipotálamo de los animales abstinentes, sin que el tratamiento con rimonabant produjera ningún efecto. Este aumento de serotonina probablemente esté relacionado con adaptaciones debidas a la ingesta crónica forzada de alcohol y no tenga relación con la modulación de la ansiedad, dado que el hipotálamo es un área principalmente implicada en los aspectos apetitivos de la ingesta, tanto de comida como de bebida (Ortiz *et al.*, 2004), y está menos implicada en el control de la ansiedad.

Estudios previos han descrito que la abstinencia al alcohol conlleva un aumento de la actividad noradrenérgica, que sería responsable de la aparición de síntomas neurovegetativos desencadenados al desaparecer el alcohol (De Witte *et al.*, 2003). Por este motivo en este trabajo se midieron también los niveles de este neurotransmisor, sin que se hayan encontrado cambios relevantes en ninguna de las áreas analizadas.

En nuestro estudio, la abstinencia al alcohol también produjo una disminución del contenido de dopamina en la amígdala y el área tegmental ventral, que fue corregida parcial o totalmente por la administración de rimonabant. El descenso en los niveles de dopamina observado en estas áreas límbicas concuerda con lo descrito en la literatura, ya que el etanol, de forma directa, es capaz de aumentar la concentración de dopamina en el núcleo accumbens (Di Chiara e Imperato, 1988), mientras que durante la abstinencia se produce el efecto opuesto, es decir, un decremento en los niveles de dopamina en estas áreas (Koob, 2003) que está asociado al estado de mayor ansiedad y depresión típicas de esta situación (Colombo, 1997).

Además de los sistemas de neurotransmisión mencionados, se han examinado también los efectos de la administración de rimonabant sobre varios neuropéptidos que han sido relacionados con la adicción al alcohol. En particular, se han analizado los posibles cambios en la expresión del NPY, el CRF y la PENK. Se ha hipotetizado que durante el desarrollo de la dependencia al alcohol se produciría un descenso en los niveles de NPY, y paralelamente un incremento en los niveles de CRF; ambas modificaciones serían otro de los cambios homeostáticos producido como consecuencia de la presencia continuada del alcohol en el

cerebro y contribuirían al aumento de la respuesta al estrés que aparece durante los periodos de abstinencia (Koob, 2003; Valdez y Koob, 2004). Nuestros resultados concuerdan parcialmente con esta hipótesis, ya que hemos encontrado un descenso significativo en los niveles del ARNm de NPY en el núcleo arcuato (la principal estructura en la que se encuentran las neuronas que sintetizan NPY) de los animales abstinentes. Sin embargo, no hemos observado diferencias en los niveles de expresión CRF, posiblemente debido a que la activación de CRF quizá está más relacionada con la el riesgo de recaída (Lê y Shaham, 2002) o con periodos de abstinencia más prolongados que el de nuestro estudio. Tampoco hemos detectado diferencias en los niveles de ARNm de PENK de los animales abstinentes, a pesar de que varios estudios han sugerido que la una transmisión opioidérgica estaría alterada durante la dependencia al alcohol o la abstinencia (Weiss y Porrino, 2002).

El hecho de que en nuestro estudio el rimonabant sea capaz de normalizar las alteraciones comportamentales y algunos de los cambios neuroquímicos desencadenados por la interrupción del consumo crónico de alcohol en ratas podría hacer pensar que, en los animales abstinentes, la actividad del sistema endocannabinoide podría estar incrementada en ciertas estructuras cerebrales. Los resultados obtenidos muestran, por el contrario, un descenso en la actividad de este sistema, con una disminución de los niveles de receptor CB₁ y menores contenidos de algunos endocannabinoides. La reducción en los niveles de CB₁ concuerda, sin embargo, con lo referido por Mitrirattanakul *et al.* (2007), quien también encontró un descenso de este receptor en el hipocampo tras dos días de abstinencia en ratas expuestas de forma crónica e intermitente al alcohol. Periodos más prolongados de abstinencia (40 días) sí se asocian con un incremento en los niveles de CB₁ (Mitrirattanakul *et al.* (2007).

Por otra parte, hemos observado una disminución en el contenido de endocannabinoides que coincide con lo descrito por González *et al.* (2004), aunque en ese estudio los análisis fueron realizados tras 48 horas desde el inicio de la abstinencia. Bajos niveles de endocannabinoides han sido asociados con respuestas comportamentales similares a las encontradas en este trabajo durante la abstinencia al alcohol, como son ansiedad, hiperlocomoción, hiperexcitabilidad, etc. Es importante destacar que las reducciones encontradas se limitan al caso de la anandamida y otras NAEs, pero no al 2-AG, lo que podría sugerir que son las enzimas implicadas en la síntesis y/o la degradación de anandamida y NAEs las que estarían involucradas en este efecto. En caso de que se tratara de una menor síntesis de endocannabinoides, se podría pensar que los bajos niveles de glutamato encontrados en la amígdala podrían afectar de forma negativa la actividad de la NAPE-PLD, puesto que la actividad de esta enzima depende de los flujos de calcio mediados por glutamato

(Hansen *et al.*, 2000). Sin embargo, este razonamiento no podría aplicarse a todas las áreas estudiadas, ya que en el estriado se ha detectado un incremento en los niveles de glutamato; esto sugeriría una influencia importante de la región cerebral en cuanto a los cambios en la síntesis de endocannabinoides provocados por la abstinencia al alcohol. La otra hipótesis a barajar para tratar de explicar el descenso en los niveles de anandamida y NAEs sería una mayor degradación de endocannabinoides por parte de la FAAH. Sin embargo, aunque se ha descrito que la FAAH está implicada en el consumo de alcohol (Sipe *et al.*, 2002; Vinod *et al.*, 2006; Blednov *et al.*, 2007), no parece que ejerza una influencia importante durante la abstinencia al alcohol, como revelan los resultados obtenidos con ratones *knockout* para la FAAH, que mostraron la misma severidad en los signos del síndrome de abstinencia a alcohol que los *wild-type* (Blednov *et al.*, 2007; aunque ver también Vinod *et al.*, 2008).

El estudio realizado corrobora la hipótesis de partida que establecía que el control farmacológico del sistema endocannabinoide es capaz de modular las distintas etapas del proceso de adicción al alcohol; además, se muestra por primera vez que el bloqueo de los receptores CB₁ con rimonabant puede atenuar la ansiedad inducida por la abstinencia al alcohol, que es uno de los signos característicos de la adicción al alcohol y, en muchas ocasiones, uno de los motivos que provocan la recaída al alcohol. Este efecto parece estar mediado por la corrección en las alteraciones de los niveles de GABA, glutamato y, en menor medida, dopamina, en áreas cerebrales implicadas en el control motor y la emoción.

5. Papel de los cannabinoides en un modelo *in vitro* de alcoholización crónica y abstinencia

Como se ha mencionado en la introducción, el consumo excesivo de alcohol, tanto agudo como crónico, así como su interrupción brusca, producen diversos síndromes neurológicos en humanos. Aunque en el caso de los humanos la neurodegeneración aparece tras periodos muy prolongados de consumo excesivo de alcohol, en modelos animales se han descrito deterioros tras solo algunos días de exposición al etanol (Obernier *et al.*, 2002a, b). Se considera que los cambios en el sistema glutamatérgico y GABAérgico son dos de los responsables fundamentales de las alteraciones neuropatológicas inducidas por el consumo crónico de etanol en el cerebro de animales de laboratorio y de humanos (Fadda y Rossetti, 1998; De Witte *et al.*, 2003). El tratamiento crónico con dosis intoxicantes de etanol provoca una regulación a la alta de los receptores NMDA (Hu y Ticku, 1995; Hoffman *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; De Witte, 2004) y el aumento de los niveles de RNA mensajeros y de las proteínas que codifican para subunidades funcionales del receptor, viéndose principalmente

afectadas las subunidades NR2A y NR2B; también la subunidad NR1, si bien los resultados respecto a esta subunidad han sido más controvertidos (Trevisan *et al.*, 1994; Follesa y Ticku, 1995, 1996; Hu *et al.*, 1996; Kumari y Ticku, 1998; Kumari, 2001; Bao *et al.*, 2001; Henninger *et al.*, 2003; Allgaier 2002; Sircar y Sircar, 2006). El conjunto de estos cambios en la expresión y densidad de estos receptores conduce a un incremento en la función y la sensibilidad del receptor NMDA (Fadda y Rossetti, 1998; Chen *et al.*, 1999; Nagy y László, 2002, Nagy *et al.*, 2003; Floyd *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2005). Estas alteraciones son consideradas la respuesta neuroadaptativa provocada por el bloqueo crónico de los receptores NMDA por el etanol y, junto con el incremento de los canales de calcio (tanto dependientes de voltaje como acoplados a receptor) que aparece durante la tolerancia, son responsables del aumento de la hiperexcitabilidad neuronal que se produce en la abstinencia tras el consumo crónico de alcohol (Grant *et al.*, 1990; Iorio *et al.*, 1992; Ahern *et al.*, 1994; de Gortari *et al.*, 2000; Dodd *et al.*, 2000; De Witte *et al.*, 2003). Paralelamente se produce un descenso en la transmisión GABAérgica, en este caso no tanto por un cambio en la densidad de los receptores tras la exposición crónica al etanol, sino más bien debido a una modificación en la composición de sus subunidades, que conlleva una alteración en la permeabilidad del canal y por tanto de la conductancia para el ion Cl⁻ (Sanna *et al.*, 1993; Morrow *et al.*, 1994; Chandler *et al.*, 1998, De Witte *et al.*, 2003). Es decir, cuando el alcohol deja de estar presente en el cerebro se ponen de manifiesto todas las modificaciones producidas como consecuencia de la presencia continuada del alcohol, lo que conduce a un aumento de la transmisión excitatoria debido, por un lado, a un aumento de la liberación del propio glutamato en áreas como el estriado (Rossetti y Carboni, 1995; Rossetti *et al.*, 1999), la amígdala (Roberto *et al.*, 2004) y el núcleo accumbens (Dahchour *et al.*, 1998), y por otro, al mayor número de receptores NMDA y al incremento de los flujos de calcio a través de canales de calcio. Este aumento de la transmisión excitatoria, junto con el descenso de la transmisión inhibitoria, pueden provocar en el sistema nervioso procesos de excitotoxicidad (Tsai *et al.*, 1995; Tsai y Coyle, 1998; Fadda y Rossetti, 1998; De Witte *et al.*, 2003).

Por otro lado, los agonistas cannabinoides han sido propuestos como posibles agentes neuroprotectores frente a diversos tipos de daño neuronal (para revisión ver Sagredo *et al.*, 2007). Los mecanismos moleculares que median esta neuroprotección son variados y pueden implicar o no a los receptores CB₁; destacan, entre otros, sus efectos antiglutamatérgicos –ya sea a través de la disminución de la liberación de glutamato (Hampson *et al.*, 1998; Marsicano y Lutz, 1999; Chen *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006), o bien a través de la modulación de la excitabilidad neuronal y de la homeostasis del calcio a través de efectos sobre receptores

NMDA y AMPA, canales de calcio, de potasio y de sodio, uniones gap y reservas intracelulares de calcio (Caulfield y Brown, 1992; Mackie y Hille, 1992; Mackie *et al.*, 1993; Hampson *et al.*, 2000; Wilson y Nicoll, 2001; Docagne *et al.*, 2007) (ver introducción). El papel neuroprotector de los agonistas cannabinoides ha sido evaluado en múltiples situaciones patológicas tanto agudas como crónicas, pero nunca en la situación de abstinencia al alcohol. Debido a que varios de los mecanismos de neuroprotección de los cannabinoides podrían influir en muchos de los procesos a través de los que se produce la neurotoxicidad durante la abstinencia al alcohol, nos propusimos estudiar el posible papel beneficioso del agonista cannabinoide HU210 en un modelo *in vitro* de exposición crónica y posterior abstinencia al alcohol. Por otra parte, también hemos querido evaluar el posible papel que juega el antagonista CB₁ SR141716 en este modelo de alcoholización y abstinencia *in vitro*. El interés de este análisis está basado en las discrepancias encontradas en los animales *knock-out* para el receptor CB₁ frente a los *wild-type* tras la exposición crónica al alcohol. Mientras que los animales *wild-type* presentan un aumento en los niveles de receptores NMDA y un descenso en los niveles de GABA_A (responsables de una parte importante del daño excitotóxico que aparece durante la abstinencia), en los animales *knock-out* no aparece ninguna modificación (Warnault *et al.* 2007). Esto pone de manifiesto la implicación del sistema endocannabinoide en el desarrollo de las modificaciones en los sistemas GABAérgico y glutamatérgico durante la exposición crónica al alcohol, y podría apuntar al bloqueo farmacológico de los receptores CB₁ como uno de los posibles medios para bloquear las modificaciones que se producen en el cerebro tras el consumo crónico de alcohol y que dan lugar a los procesos de excitotoxicidad durante el periodo de abstinencia mencionados previamente.

En este diseño experimental se ha desarrollado un modelo *in vitro* de alcoholización y posterior abstinencia en cultivos primarios de neuronas corticales, para estimar en primer lugar la aparición de un posible efecto neurotóxico debido a la alcoholización crónica y posterior abstinencia, así como de un posible incremento en la sensibilidad al daño excitotóxico. Se ha evaluado asimismo el posible papel beneficioso del agonista cannabinoide HU210 y del antagonista CB₁ SR141716 sobre la hiperexcitabilidad asociada a la abstinencia alcohólica, y se han analizado los posibles mecanismos moleculares que podrían mediar estos efectos. En este modelo de alcoholización y abstinencia a alcohol en cultivos de neuronas no se detectan variaciones en el nivel basal de muerte celular debida al tratamiento crónico con alcohol durante 5 días o a la abstinencia durante 48h tras tres días de alcoholización. Sin embargo, hemos observado un marcado incremento en la sensibilidad de las neuronas abstinentes al daño excitotóxico inducido por la administración de NMDA en el medio de cultivo. En el

caso de la alcoholización crónica no se detecta un incremento de la sensibilidad al daño excitotóxico inducido por la alcoholización; por el contrario, el nivel de muerte neuronal inducida por la presencia de NMDA es incluso menor que en los controles expuestos a NMDA. Este paradójico efecto aparentemente neuroprotector es debido a la presencia del alcohol en el medio, que actúa inhibiendo los receptores NMDA, como queda demostrado al aplicar conjuntamente etanol y NMDA a neuronas nunca expuestas al alcohol. La inhibición de la función glutamatérgica ha sido previamente descrita por otros autores (Lovinger *et al.*, 1989; Gonzales y Jaworski, 1997).

En este modelo de alcoholización crónica y abstinencia *in vitro*, hemos encontrado un marcado descenso en los niveles de expresión de la subunidad NR2A de los receptores NMDA, sin que se hayan encontrado cambios significativos en las subunidades NR2B ni NR1. Se ha sugerido que la activación de receptores NMDA que contienen subunidades NR2A promovería la supervivencia neuronal y ejercería un papel neuroprotector contra el daño neuronal mediado tanto por receptores NMDA como no-NMDA, mientras que la activación de los receptores que contienen subunidades NR2B resultaría en procesos excitotóxicos que aumentan la muerte neuronal (Liu *et al.* 2007). Si esta hipótesis es correcta, el descenso en la expresión de subunidades NR2A encontrado en nuestro estudio podría estar asociado con un descenso del número de receptores “tróficos”, y aunque la expresión de subunidades NR2B que promueven la excitotoxicidad no varía, el balance global de subunidades NR2A (tróficas)/ NR2B (tóxicas) del cerebro se vería alterado y conduciría a una mayor sensibilidad a los procesos excitotóxicos mediados por NR2B.

En nuestro estudio hemos examinado los posibles cambios de expresión de las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A. Los resultados muestran una tendencia a la baja en la expresión de la subunidad $\alpha 1$ en las condiciones de abstinencia y alcohol crónico, y un incremento en los niveles de expresión de la subunidad $\beta 3$ en los mismos grupos experimentales, aunque este incremento tampoco alcanza significación estadística. Estos resultados encajan con los resultados publicados por otros autores en diversas áreas cerebrales de rata (Mhatre *et al.*, 1993; Mhatre y Ticku, 1994) y en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón (Sheela Rani y Ticku, 2006), y apoyarían la hipótesis de un aumento en la sensibilidad de las neuronas al daño excitotóxico debido a los cambios en la composición de las subunidades de estos receptores.

No hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión del receptor CB₁ tras la administración crónica de alcohol durante 5 días, lo que concuerda con los resultados publicados por González *et al.* (2002a), donde se describe la ausencia de

modificaciones tras el consumo crónico (7 días) de alcohol sobre la expresión del ARNm o sobre la densidad del receptor CB₁ en diversas áreas cerebrales de ratas. Sin embargo, los resultados en cuanto a los cambios de expresión del receptor CB₁ tras la exposición crónica al alcohol son controvertidos, ya que también se han descrito regulación a la baja y desensibilización de los mecanismos de transducción de señales a través de estos receptores tras la exposición crónica al alcohol en cerebros de ratones C57BL/6 (Basavarajappa y Hungund, 1999a), y un descenso en la expresión del receptor CB₁ tras la exposición crónica forzada al alcohol en distintas áreas cerebrales de ratas Wistar (Ortiz *et al.*, 2004). La razón de estas diferencias no está clara, aunque quizás sea debida a los distintos protocolos de administración del alcohol o a la duración del tiempo de alcoholización. Tampoco se han detectado diferencias en la expresión de la principal enzima responsable de la degradación de endocannabinoides, FAAH, en ninguna de nuestras condiciones experimentales. Hay que tener en cuenta que nuestros análisis únicamente han determinado la expresión del ARNm tanto de CB₁ como de FAAH, por lo que cabe la posibilidad de que sean los niveles de proteína los que se encuentren alterados y que no aparezcan modificaciones a nivel de mensajero en el momento del análisis. Por otro lado también hay que pensar en las grandes diferencias entre los modelos *in vivo* e *in vitro*, que en ocasiones hacen difícil la comparación entre resultados.

Puesto que los agonistas cannabinoides son capaces de prevenir la muerte neuronal por excitotoxicidad en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* (Marsicano y Lutz, 1999; Hampson *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2006; Docagne *et al.*, 2007), nos propusimos evaluar el posible papel neuroprotector del agonista HU210 en este modelo de abstinencia alcohólica *in vitro*. Una de las hipótesis barajadas para explicar el posible efecto neuroprotector del HU210 es que, si la administración se produce durante el periodo de alcoholización, quizá la presencia de este agonista durante este periodo bloquearía o atenuaría el desarrollo de las adaptaciones que el cerebro pone en marcha cuando es expuesto de forma crónica al alcohol, y que son responsables del estado de hiperexcitabilidad que aparece durante la abstinencia al alcohol. Por este motivo, administramos HU210 al mismo tiempo que el etanol, y observamos que, efectivamente, el grupo de abstinencia tratado con HU210 mostraba de forma significativa menor muerte provocada por la presencia de NMDA que el grupo abstinencia sin HU210. No se encontraron modificaciones al analizar la expresión de los genes que previamente habían sido implicados en la mayor sensibilidad al daño excitotóxico (subunidades NR2A del receptor NMDA, y $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A), al comparar las neuronas tratadas crónicamente con HU210 frente a sus controles respectivos

(abstinencia y etanol crónico). Esto sugeriría que no se producen modificaciones en la expresión de las adaptaciones inducidas por el alcohol cuando se administra conjuntamente este agonista cannabinoide, y que no es a través del bloqueo de estas adaptaciones la forma en que el HU210 protege a las neuronas. Además, otro dato que indica que no es a través del bloqueo de las neuroadaptaciones inducidas por el alcohol es que incluso la administración de HU210 desde el inicio de la abstinencia también protege a las neuronas del daño excitotóxico inducido por la administración de NMDA, y esta neuroprotección es, de nuevo, exclusiva de la situación de abstinencia al alcohol y no aparece en los controles expuestos a NMDA.

Con respecto al SR141716, nuestros resultados muestran un agravamiento del daño excitotóxico tanto en la situación control como en la de abstinencia, tras administrar este antagonista de forma crónica durante el periodo de alcoholización y posterior abstinencia. Los análisis de la expresión de las subunidades NR2A del receptor NMDA y $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A muestran de forma general que, tras administrar crónicamente SR141716, aparece un descenso en los niveles de expresión de todos los genes estudiados. Este descenso generalizado, especialmente el encontrado en la subunidad NR2A, podría contribuir al incremento en la sensibilidad al daño excitotóxico que aparece en la situación de abstinencia; aunque no explicaría por qué el grupo control es también más sensible a la excitotoxicidad tras la administración crónica de SR141716. Por otra parte, los resultados encontrados con el SR141716 contrastan con los resultados referidos por Warnault *et al.* (2007), en los que se observó que, mientras que los animales *wild-type* presentaban un aumento en los niveles de receptores NMDA y un descenso en los niveles de GABA_A tras la exposición crónica al alcohol, en los animales *knock-out* para el receptor CB₁ no aparecía ninguna modificación. Sin embargo, hay que tener en cuenta las diferencias entre la manipulación genética del receptor CB₁ y su bloqueo farmacológico; además nuestro modelo se ha llevado a cabo en cultivos de neuronas, lo que difiere en gran medida de un estudio *in vivo*.

En resumen, en este diseño experimental se ha desarrollado un modelo *in vitro* de alcoholización y posterior abstinencia en cultivos primarios de neuronas corticales, en el que hemos observado un incremento en la sensibilidad de las neuronas abstinentes al daño excitotóxico inducido por la administración de NMDA en el medio de cultivo. Este incremento de la sensibilidad de las neuronas del grupo de abstinencia al daño excitotóxico podría estar mediado por cambios encontrados en la expresión de algunos de los genes que han sido implicados en el desarrollo de la tolerancia al alcohol y la aparición del síndrome de abstinencia, como son las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A, y sobretodo la subunidad NR2A del receptor NMDA, que sufre un marcado descenso tanto en la situación

de abstinencia como tras la alcoholización crónica. No hemos observado modificaciones en los niveles de expresión del receptor CB₁ ni de la enzima FAAH. La administración del agonista cannabinoide HU210, ya sea coadministrado con el etanol durante el periodo de alcoholización o incluso únicamente durante periodo de abstinencia, es capaz de proteger a las neuronas del grupo de abstinencia de la muerte por excitotoxicidad inducida por el NMDA, sin que tenga efectos sobre las neuronas no abstinentes. Este efecto neuroprotector no parece estar mediado por correcciones en los niveles de expresión de las subunidades mencionadas de los receptores GABA_A ni NMDA. Por el contrario, el antagonista CB₁ SR141716 potencia el daño excitotóxico tras ser administrado de forma crónica al cultivo, tanto en la situación de abstinencia como en la situación control. Este efecto podría ser consecuencia del descenso general en los niveles de expresión de los genes estudiados, especialmente el encontrado en la subunidad NR2A, tanto en la situación de abstinencia como de alcoholización crónica.

Los datos mostrados profundizan en el estudio de los cambios inducidos en las neuronas por la administración crónica de alcohol y la abstinencia, y muestran, por primera vez, el papel beneficioso del agonista cannabinoide HU210 en los procesos excitotóxicos que pueden aparecer asociados a la abstinencia alcohólica.

Integración de los resultados obtenidos en el conjunto de experimentos realizados

Como resumen global de los datos obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral, podemos destacar varios puntos importantes. Los resultados en los experimentos correspondientes a la **administración aguda de alcohol** muestran que este tipo de administración **provoca un descenso generalizado en el contenido de endocannabinoides y NAEs en diversas áreas cerebrales implicadas en la adicción, los procesos de refuerzo, el control motor, el control de la ingesta y el estrés**. Además, estas reducciones encontradas en los niveles de endocannabinoides y NAEs tras la administración aguda de alcohol **podrían estar relacionadas, en algunos casos, con un aumento en su tasa de degradación por parte de la enzima FAAH**. Además, **se produce en estas condiciones un descenso en los niveles de receptor CB₁ en algunas de las regiones analizadas**, que podría ser una forma de mecanismo adaptativo: al haber menores contenidos de ligandos, se necesitarían menos receptores disponibles o viceversa. El descenso encontrado en estos compuestos, junto con la disminución de los niveles del receptor CB₁ podrían estar relacionados con los efectos comportamentales que provoca el consumo agudo de alcohol (descoordinación motora, déficits de atención, irritabilidad...), así como con el inicio de los cambios neuroadaptativos que aparecen asociados al consumo crónico de alcohol.

En nuestros análisis hemos observado **marcadas diferencias en el patrón de variación del receptor CB₁ y de la enzima FAAH en función del tipo de administración de alcohol**. Así, mientras que tras la exposición crónica ininterrumpida al alcohol hemos observado cambios específicos en los niveles de ambos elementos del sistema endocannabinoide en el bulbo olfatorio y la amígdala, tras la exposición intermitente al alcohol en forma de ciclos de sucesivos de alcoholizaciones y abstinencias no hemos encontrado variaciones en los niveles de FAAH en ninguna de las áreas analizadas, y en el caso del receptor CB₁ únicamente hemos detectado un incremento en la corteza prefrontal de los animales abstinentes. Estos resultados podrían ser interpretados en términos de la capacidad del cerebro para desarrollar neuroadaptaciones conducidas a contrarrestar el daño que supone la presencia crónica del alcohol en el cerebro, cuando éste es administrado de forma constante. Sin embargo, **una administración no constante de alcohol, en forma de ciclos de alcoholización y abstinencia, quizás no permitiría el desarrollo de adaptaciones sostenidas en el cerebro a nivel del sistema cannabinoide endógeno**, lo que podría ser a su vez relacionado con los efectos diferentes ya descritos sobre otros sistemas de neurotransmisión (GABA, glutamato, dopamina) en función del tipo de administración de alcohol, y que han sido referidos como factores importantes que determinan la gravedad o el alcance de los procesos excitotóxicos que aparecen durante los sucesivos periodos de abstinencia (Brown *et al.*, 1988; Booth y Blow, 1993; Becker, 1998; De Witte *et al.*, 2003).

Otro de los hallazgos importantes de este estudio es el hecho de que, a pesar de que se ha descrito que el consumo crónico de alcohol provocaría una hiperactividad generalizada del sistema cannabinoide endógeno (para revisión, ver Basavarajappa, 2007), nosotros hemos observado **cambios tras la exposición crónica ininterrumpida al alcohol que varían en función del área cerebral analizada**. Así, mientras que en el bulbo olfatorio aparece efectivamente una disminución en los niveles del receptor CB₁ que está acompañada de un descenso en los niveles de la enzima FAAH (es decir, podría corresponder con estado de hiperactividad endocannabinoide, con un incremento en el contenido de endocannabinoides debido al descenso en su tasa de degradación, lo cual sería compensado con una regulación a la baja de los receptores CB₁), en la amígdala hemos detectado un aumento en los niveles del receptor CB₁, acompañado de un aumento en la expresión de FAAH (es decir, habría en este caso una mayor degradación de endocannabinoides que trataría de ser compensada con un incremento en los niveles de receptor CB₁). Estos resultados, junto con los encontrados en el resto de estudios presentados en los que se analizan la presencia o expresión del receptor CB₁ o de la enzima FAAH, y/o los niveles de endocannabinoides, constituyen uno de los

principales hallazgos de esta tesis doctoral, ya que pondrían de manifiesto la **especificidad regional de la respuesta endocannabinoide a la presencia del alcohol en el cerebro**. Así, podría ocurrir que en un área la respuesta sea una hiperactividad endocannabinoide, mientras que en otra sea una menor actividad. Se podría hipotetizar a partir de estos datos que el sistema cannabinoide endógeno podría jugar un papel importante a la hora de coordinar los cambios neuroadaptativos en cada región, en función del tono neuroquímico general de cada región en particular; o dicho de otra manera, en función de las diferencias en subpoblaciones neuronales y/o gliales en cada región, y considerando el tipo de subpoblación en la que estarían localizados el receptor CB₁ u otros elementos de este sistema en cada región. Por ejemplo, se ha propuesto que los endocannabinoides liberados por las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral serían capaces de modular la liberación por parte de las aferencias tanto GABAérgicas como glutamatérgicas que reciben, a través de su papel como mensajeros retrógrados (Alger, 2002; Wilson y Nicoll, 2002). Aunque las consecuencias de esta modulación de la actividad de las aferencias no han sido del todo establecidas, se ha propuesto que la contribución de la regulación GABAérgica y glutamatérgica dependiente de cannabinoides sobre la actividad de estas neuronas dopaminérgicas dependerá del nivel relativo de activación de ambas vías aferentes, bajo distintas circunstancias comportamentales (Riegel y Lupica, 2004). Por tanto, se podría hipotetizar que, del mismo modo que en el área tegmental ventral, el sistema endocannabinoide podría responder a la presencia continuada del alcohol modulando su actividad en cada área cerebral particular, en función del tono neuroquímico aferente predominante de cada región.

Los resultados obtenidos en muestras humanas corroboran en cierta forma los datos obtenidos en animales de experimentación en los que se observan cambios en la expresión de los receptores CB₁ y de la enzima FAAH que son específicos, una vez más, de cada región analizada. Así, en la corteza prefrontal hemos encontrado un descenso en los niveles de la enzima FAAH en los sujetos alcohólicos frente a los controles dentro del grupo suicidio. La menor expresión de esta enzima podría corresponder a un descenso en la tasa de degradación de endocannabinoides, es decir, a un incremento en el contenido de estos compuestos en la corteza prefrontal de los sujetos alcohólicos comparados con los controles. Paralelamente al descenso en los niveles de FAAH hemos detectado una mayor densidad de receptores CB₁ en los sujetos alcohólicos al compararlos con los controles, siempre dentro del grupo “suicidio”. Este aumento en la densidad de receptores está sin embargo contrarrestado por un descenso en su afinidad, que ocurre quizás como respuesta al aumento en el contenido de endocannabinoides en esta región. En el caso del hipocampo hemos observado que

aparecen los mismos perfiles en cuanto a densidad y afinidad del receptor CB₁ que en el caso de la corteza prefrontal, aunque en este caso la hipótesis de que el incremento en la densidad y el descenso paralelo en la afinidad de los receptores CB₁ en los sujetos alcohólicos suicidas frente a los controles del grupo suicidio se produzcan como consecuencia de los cambios en el contenido de endocannabinoides no sería válida, puesto que no hemos detectado cambios en la expresión de la enzima FAAH en esta región. Por el momento, solo un artículo ha sido publicado en la literatura acerca de las modificaciones en los niveles y funcionalidad de los receptores CB₁ y los contenidos de endocannabinoides en la corteza prefrontal de sujetos alcohólicos víctimas de suicidio o cuya muerte se produjo por causas naturales (Vinod *et al.*, 2005). En este trabajo se mostró un incremento en los niveles de estos ligandos acompañado de un aumento en el número y la funcionalidad de los receptores CB₁ en el grupo de alcohólicos suicidas, lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio en la corteza prefrontal y el hipocampo; sin embargo en su estudio las diferencias encontradas son claramente debidas al factor suicidio, puesto que la comparación se realizó entre alcohólicos suicidas y no suicidas.

Otro de los grandes objetivos de esta tesis doctoral fue el estudio del potencial terapéutico de los cannabinoides en el alcoholismo. Para ello realizamos dos tipos de aproximaciones: una más centrada en el tratamiento de los síntomas, como fué el estudio *in vivo* de los efectos del antagonista cannabinoide SR141716 (rimonabant) sobre la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica, y otro más centrado en aspectos de neurotoxicidad/neuroprotección, como fue el estudio de los efectos del agonista cannabinoide HU210 y de nuevo del antagonista SR141716 en un modelo *in vitro* de alcoholización y abstinencia.

En el primer diseño experimental nos propusimos evaluar el posible papel beneficioso del rimonabant durante la abstinencia alcohólica temprana en ratas. La hipótesis de un potencial efecto beneficioso estaba basada en la descripción en datos de la literatura que describían una completa ausencia de signos de abstinencia alcohólica en animales *knock-out* para el receptor CB₁ (Racz *et al.*, 2003). De acuerdo con estos resultados, los experimentos realizados al administrar rimonabant a dosis bajas al inicio de la interrupción del consumo de alcohol mostraron que el **este antagonista presentaba un efecto ansiolítico en el caso particular de la abstinencia alcohólica**, donde los animales presentan unos mayores niveles de ansiedad en el laberinto en cruz elevado. Para tratar de esclarecer los mecanismos neuroquímicos que subyacían al efecto ansiolítico del rimonabant en esta situación, analizamos el estado de varios neurotransmisores y neuropéptidos en regiones cerebrales implicadas en el

control motor, el estrés, la emoción y la ingesta. Los datos obtenidos revelaron variaciones en los niveles de GABA, glutamato y dopamina en varias áreas cerebrales de los animales abstinentes que encajaban con la situación de desregulación entre los sistemas inhibitorio y excitatorio, así como con los cambios en los contenidos de dopamina descritos para la situación de abstinencia por otros autores (para revisión, ver Koob y Le Moal, 2001; Weiss y Porrino, 2002; De Witte *et al.*, 2003). Los resultados en cuanto a niveles de serotonina y noradrenalina parecerían indicar que, en este modelo, estos neurotransmisores no jugarían un papel importante en la manifestación de los síntomas de abstinencia. Asimismo, se cuantificaron los niveles de NPY y CRF en varias regiones cerebrales de estos animales, observándose variaciones en los niveles de NPY que concuerdan con la hipótesis de la desregulación entre el NPY y el CRF en el incremento del estrés asociado al desarrollo de la adicción al consumo de drogas (para revisión ver Koob y Le Moal, 2001; Le Moal y Koob, 2007). Los datos obtenidos mostraron que **la administración de rimonabant en los animales abstinentes corregía parcial o totalmente varios de los cambios producidos en los contenidos de GABA, glutamato y dopamina en algunas de las regiones analizadas**. Estas correcciones podrían ser responsables, al menos en parte, del efecto de tipo ansiolítico que aparece en los animales abstinentes tras la administración de rimonabant. Sorprendentemente, la mejoría neuroquímica y comportamental inducida por la administración de rimonabant en esta situación no se producía a través de la mejora o la normalización de una transmisión cannabinoide que podría estar exacerbada y que estaría contribuyendo a la aparición de los síntomas del síndrome de abstinencia, como demuestran los datos que han mostrado una disminución en los niveles de receptor CB₁ y un menor contenido en anandamida y otras NAEs.

El conjunto de resultados obtenidos en este apartado son importantes, puesto que aportan nuevos datos a las investigaciones que apuntan al control farmacológico del sistema cannabinoide endógeno como una posible diana terapéutica en el tratamiento del alcoholismo. En la literatura científica se han publicado varios trabajos que muestran la capacidad de diversos fármacos que actúan sobre distintos puntos del sistema endocannabinoide para modular varios aspectos del proceso de adicción al alcohol, en estirpes de animales de laboratorio tanto preferentes como no preferentes (Arnone *et al.*, 1997; Colombo *et al.*, 1998; Gallate *et al.*, 1999; Freedland *et al.*, 2001; Serra *et al.*, 2001, 2002; Colombo *et al.*, 2002a, 2004b; Hansson *et al.*, 2007; Cippitelli *et al.*, 2007; Blednov *et al.*, 2007; Vinod *et al.*, 2008). Estos datos sugieren de forma clara que agentes que actúan sobre el sistema cannabinoide endógeno como el rimonabant u otros constituyen agentes terapéuticos prometedores en el tratamiento del

alcoholismo. Actualmente este antagonista CB₁, comercializado por la compañía Sanofi-Aventis bajo el nombre de Acomplia[®], es un medicamento ya aprobado en la Unión Europea como ayuda en el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso (<http://en.sanofi-aventis.com>), y se encuentra en fase III de un ensayo clínico como tratamiento para dejar de fumar. Además, se está llevando a cabo un ensayo clínico en fase I llevado a cabo por el *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA) para investigar la efectividad del rimonabant para reducir el consumo voluntario de alcohol (http://clinicalstudies.info.nih.gov/cgi/detail.cgi?B_2004-AA-0072.html).

Para profundizar más en el estudio del papel beneficioso de los compuestos cannabinoides en el alcoholismo, desarrollamos un modelo de alcoholización y posterior abstinencia *in vitro* en el que estudiamos los efectos de la administración crónica de alcohol sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocannabinoide, sin que se observaran diferencias en la expresión del receptor CB₁ ni de la enzima FAAH. En este modelo detectamos variaciones en algunos de los genes que han sido implicados en el desarrollo de tolerancia al alcohol y en los procesos de excitotoxicidad neuronal asociados a la interrupción del consumo de alcohol, como son las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 3$ del receptor GABA_A, y sobretodo en la subunidad NR2A del receptor NMDA. Los cambios detectados en la expresión de estos genes podrían influir en la sensibilidad incrementada al daño excitotóxico que aparece en este modelo *in vitro* cuando se administra NMDA durante la abstinencia al alcohol. **Al administrar de forma crónica el agonista cannabinoide HU210 durante todo el periodo de administración del alcohol observamos un efecto neuroprotector** que no parece estar mediado por el bloqueo de los cambios en ninguna de las subunidades analizadas mencionadas previamente, puesto que no hemos detectado variaciones en los niveles de ninguno de ellos, y como sugiere además el hecho de que **incluso la administración subcrónica, a partir del inicio de la abstinencia, también tiene un efecto neuroprotector sobre el daño excitotóxico**. Es importante destacar que **el efecto neuroprotector aparece asociado únicamente a la situación de abstinencia alcohólica**, y no a la situación control. Por el contrario, **la administración crónica de rimonabant durante el periodo de alcoholización provoca mayor daño neuronal cuando se induce el daño excitotóxico tanto en la situación de abstinencia alcohólica como en el control**, posiblemente debido a cambios en las subunidades $\alpha 1$ del receptor GABA_A y NR2A del receptor NMDA.

Los resultados encontrados en este modelo *in vitro* pondrían de manifiesto la **posible influencia del sistema cannabinoide endógeno en el desarrollo de las**

neuroadaptaciones que se ponen en marcha durante el desarrollo de tolerancia al alcohol, y que conducen posteriormente a la aparición de procesos excitotóxicos y perjudiciales para el cerebro. Una primera evidencia indirecta la podríamos encontrar en el hecho de que la administración de rimonabant a animales abstinentes es capaz de mejorar la ansiedad asociada a la abstinencia alcohólica a través de mecanismos indirectos, es decir, no a través del bloqueo de una transmisión endocannabinoide incrementada, sino a través de la corrección total o parcial de la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica o dopaminérgica en diversas áreas cerebrales. Una evidencia más directa del papel modulador del sistema cannabinoide endógeno en el desarrollo de las adaptaciones neuronales a la presencia crónica de alcohol es el hecho de que el rimonabant administrado de forma crónica *in vitro* provoca cambios en la expresión de varios genes implicados en los procesos de neurotoxicidad durante la abstinencia al alcohol. Estos resultados contradictorios acerca del papel positivo del rimonabant en la mejora de la sintomatología de la abstinencia alcohólica, y de un papel perjudicial en la toxicidad durante este mismo periodo ponen de manifiesto la complejidad de las relaciones entre la transmisión endocannabinoide y el desarrollo de las neuroadaptaciones que conducen a la tolerancia al alcohol y a la posterior aparición de los síntomas de abstinencia cuando el consumo de alcohol es interrumpido. Sería por tanto necesario realizar más experimentos para poder dilucidar: (i), el efecto *in vivo* de la administración crónica de rimonabant durante el periodo de alcoholización y posterior abstinencia; (ii), las posibles modificaciones a nivel de la transmisión glutamatérgica, GABAérgica y dopaminérgica que tendría la administración crónica de rimonabant en estas condiciones; y (iii), el efecto del rimonabant crónicamente sobre la neurodegeneración inducida por la(s) abstinencia(s) al alcohol.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONS

The main aim of this Doctoral Thesis has been to extend the already existing data on the knowledge of the relationship between the endocannabinoid system and alcohol addiction, in search of (i) exploring those aspects of this relationship that has not been deeply described in the scientific literature, and (ii) to give support to the possibility of developing new therapeutical strategies for alcoholism based on the actions on the endocannabinoid system. From the set of results obtained during this Thesis, we would like to take out these main findings:

1. Alcohol administration to both laboratory animals and humans causes changes on the endocannabinoid system. These changes are specific of the analyzed brain region, the time and the sort of alcohol administration.
2. Laboratory animals exposed to acute alcohol show a reduction in their endocannabinoid activity expressed as a decrease in the contents of both endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines. These changes are associated to an increase in FAAH density and a decrease in CB₁ receptor levels, in emotion- and cognitive-related brain areas.
3. Chronic alcohol administration leads to changes in FAAH and CB₁ receptor expression in limbic areas. The specific pattern of changes found could suggest a specific and selective hyperactivity or hypoactivity response of the endocannabinoid system upon particular brain regions.
4. Alcohol consumption in successive cycles of alcoholisation and withdrawal induces different modifications on the endocannabinoid system than does chronic alcohol consumption. This “no-adaptation” of the endocannabinoid system could contribute to the different pattern of changes on the neurotransmission systems implicated in the development of alcohol tolerance described by other authors, which aggravate alcohol withdrawal situation.
5. In humans, chronic alcohol consumption leads to changes in CB₁ and FAAH expression in emotion-related and learning brain areas. These findings extend the data obtained in laboratory animals that point to the endocannabinoid system as a new therapeutical target in alcohol addiction.
6. CB₁ antagonist rimonabant has been shown as an effective treatment to ameliorate increased anxiety associated to alcohol withdrawal in rats. This amelioration could

be due to the normalisation of imbalances found in GABA, glutamate and dopamine levels in emotion- and motor-related areas.

7. Cannabinoid agonist HU210 has neuroprotective properties on the hyperexcitability state associated with alcohol withdrawal in an *in vitro* model of chronic alcoholisation and withdrawal.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Addoloratto, G., Caputo, F., Capristo, E., Colombo, G. y Gessa, G.L. (2000) "Ability of baclofen in reducing alcohol craving and intake. II. Preliminary clinical evidence". *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **24**: 67-71.
- Addoloratto, G., Caputo, F., Capristo, E., Domenicali, M., Bernardi, M., Janiri, L., Agabio, R., Colombo, G., Gessa, G.L. y Gasbarrini, G. (2002) "Baclofen efficacy in reducing alcohol craving and intake: a preliminary double-blind randomized controlled study". *Alcohol & Alcoholism* **37**: 504-508.
- Ahern, K.B., Lustig, H.S. y Greenberg, D.A. (1994) "Enhancement of NMDA toxicity and calcium responses by chronic exposure of cultured cortical neurons to ethanol" *Neurosci Lett*; **165**:211-4.
- Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., Marsicano, G., Kokaia, Z., Guzmán, M. y Galve-Roperh, I. (2005) "The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation" *FASEB J.* **19**: 1704-6.
- Alger, B.E. (2002) "Retrograde signalling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids". *Progress in Neurobiology* **68**: 247-286.
- Allgaier, C. (2002) "Ethanol sensitivity of NMDA receptors" *Neurochem Int.* **41 (6)**: 377-82.
- Álvarez-González, F.J. y Del Río Gracia, C. (2003) "Farmacología del alcohol". En: Manual SET de alcoholismo -1ª Ed. – Madrid: Médica Panamericana. Pp: 109-129.
- Anstrom, K.K., Cromwell, H.C., Markowski, T. y Woodward, D.J. (2003) "Effect of baclofen on alcohol and sucrose self-administration in rats" *Alcohol Clin Exp Res.* **27(6)**:900-8.
- Arévalo, C., De Miguel, R. y Hernández-Tristán, R. (2001) "Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **70**: 23-31.
- Ariwodola, O.J. y Weiner, J.L. (2004) "Ethanol potentiation of GABAergic synaptic transmission may be self-limiting: role of presynaptic GABA_B receptors". *The Journal of Neuroscience* **24 (47)**: 10679-10686.
- Arnone, M., Maruani, J., Chaperon, F., Thiebot, M.H., Poncelet, M., Soubrie, P. y Le Fur, G. (1997) "Selective inhibition of sucrose and ethanol intake by SR 141716, an antagonist of central cannabinoid (CB1) receptors". *Psychopharmacology (Berl)*. **132 (1)**:104-6.
- Arnsten, A.F. y Li, B.M. (2005) "Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions" *Biol Psychiatry*. **57(11)**:1377-84.

- Ashton, J.C., Rahman, R.M., Nair, S.M., Sutherland, B.A., Glass, M. y Appleton, I. (2007) "Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain" *Neurosci Lett.* **412(2)**:114-7.
- Ayesta, F.J. (2002) "Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol". En: "Monografía del alcohol" Editor: Antoni Gual. *Adicciones*, Vol. 14, suplemento 1. Pp: 63-78.
- Bailey, S.M., Patel, V.B., Young, T.A., Asayama, K. y Cunningham, C.C. (2001) "Chronic Ethanol Consumption Alters the Glutathione/Glutathione Peroxidase-1 System and Protein Oxidation Status in Rat Liver" *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **25 (5)**: 726-733.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L. y Hiley, C.R. (2006) "In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor" *Trends Pharmacol Sci.* **27(1)**: 1-4.
- Baldwin, H.A., Rassnick, S., Rivier, J., Koob, G.F. y Britton, K.T. (1991) "CRF antagonist reverses the "anxiogenic" response to ethanol withdrawal in the rat" *Psychopharmacology* **103**, 227-232.
- Bao, X., Hui, D., Naassila, M. y Michaelis, E.K. (2001) "Chronic ethanol exposure increases gene transcription of subunits of an N-methyl-D-aspartate receptor-like complex in cortical neurons in culture" *Neurosci Lett*, **315**:5-8.
- Barth, F. y Rinaldi-Carmona, M. (1999) "The development of cannabinoid antagonists" *Curr. Med. Chem.* **6**, 745-755.
- Basavarajappa, B.S., Cooper, T.B. y Hungund, B.L. (1998) "Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane" *Brain Res.* **793(1-2)**: 212-8.
- Basavarajappa, B.S. y Hungund, B.L. (1999a) "Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S] GTPγS binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse". *Brain Research* **815**: 89-97.
- Basavarajappa, B.S. y Hungund, B.L. (1999b) "Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist, anandamide and its precursor N-arachidonyl phosphatidyl ethanolamine in SK-N-SH cells". *Journal of Neurochemistry* **72**: 522-528.
- Basavarajappa, B.S. y Hungund, B.L. (2001) "Cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S] GTPγS binding in the brain of C57BL/6 and DBA/2 mice". *Journal of Neuroscience Research* **64**: 429-436.

- Basavarajappa, B.S. y Hungund, B.L. (2002) "Neuromodulatory role of the endocannabinoid signaling system in alcoholism: an overview". *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids* **66**: 287-299.
- Basavarajappa, B.S., Saito, M., Cooper, T.B. y Hungund, B.L. (2003) "Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons" *Eur J Pharmacol.* **466(1-2)**: 73-83.
- Basavarajappa, B.P. y Hungund, B.L. (2005) "Role of the endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol" *Alcohol & Alcoholism* **40 (1)**: 15-24.
- Basavarajappa, B.S., Yalamanchili, R., Cravatt, B.F., Cooper, T.B. y Hungund, B.L. (2006) "Increased ethanol consumption and preference and decreased ethanol sensitivity in female FAAH knockout mice" *Neuropharmacology* **50**, 834-844.
- Basavarajappa, B.S. (2007) "The endocannabinoid signaling system: a potential target for next-generation therapeutics for alcoholism" *Mini Rev Med Chem.* **7(8)**: 769-779.
- Becker, H.C. y Hale, R.L. (1993) "Repeated episodes of ethanol withdrawal potentiate the severity of subsequent withdrawal seizures: an animal model of alcohol withdrawal "kindling"" *Alcohol Clin Exp Res.* **17(1)**: 94-8.
- Becker, H.C., Díaz-Granados, J.L. y Weathersby, R.T. (1997) "Repeated Ethanol Withdrawal Experience Increases the Severity and Duration of Subsequent Withdrawal Seizures in Mice" *Alcohol* **14(4)**:319-326.
- Becker, H.C. (1998) "Kindling in alcohol withdrawal" *Alcohol Health Res World.* **22(1)**:25-33.
- Becker, H.C., Veatch, L.M. y Diaz-Granados, J.L. (1998) "Repeated ethanol withdrawal experience selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drugs in mice" *Psychopharmacology (Berl).* **139(1-2)**: 145-53.
- Begg, M., Pacher, P., Bátakai, S., Osei-Hyiaman, D., Offertáler, L., Mo, F.M., Liu, J. y Kunos, G. (2005) "Evidence for novel cannabinoide receptors". *Pharmacology and Therapeutics* **106**: 133-145.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A. y Piomelli, D. (1997) "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition" *Science* **277**: 1094-1097.

- Benito, C., Núñez, E., Tolón, R.M., Carrier, E.J., Rábano, A., Hillard, C.J. y Romero, J. (2003) "Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains" *J. Neurosci.* **23**: 11136-41.
- Benito, C., Romero, J.P., Tolón, R.M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C.J., Guaza, C. y Romero, J. (2007) "Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis" *J Neurosci.* **27(9)**:2396-402.
- Bertoglio, L.J. y Carobrez A.P. (2002) "Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **73 (4)**: 963-969.
- Besheer, J., Lepoutre, V. y Hodge, C.W. (2004) "GABA_B receptor agonists reduce operant ethanol self-administration and enhance ethanol sedation in C57BL/6J mice" *Psychopharmacology* **174**: 358-366.
- Bisogno, T., Melck, D., De Petrocellis, L., Bobrov, M.Yu, Gretskaya, N.M., Bezuglov, V.V. et al. (1998) "Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**: 515-22.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J.J. y Di Marzo, V. (1999) "Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256 (2)**: 377-380.
- Blázquez, C., Carracedo, A., Barrado, L., Real, P.J., Fernández-Luna, J.L., Velasco, G., Malumbres, M., Guzmán, M. (2006) "Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma" *FASEB J.* **20(14)**: 2633-5.
- Blednov, Y.A., Cravatt, B.F., Boehm, S.L. 2nd, Walker, D. y Harris, R.A. (2007) "Role of endocannabinoids in alcohol consumption and intoxication: studies of mice lacking fatty acid amide hydrolase" *Neuropsychopharmacology* **32(7)**: 1570-82.
- Bonci, A., Bernardi, G., Grillmer, P. y Mercuri, N.B. (2003) "The dopamine-containing neuron: maestro or simple musician in the orchestra of addiction?" *TRENDS in Pharmacological Sciences* **24**: 172-177.
- Booth, B.M. y Blow, F.C. (1993) "The kindling hypothesis: further evidence from a U.S. national study of alcoholic men" *Alcohol Alcohol.* **28(5)**: 593-8.

- Bradshaw, H.B., Rimmerman, N., Krey, J.F. y Walker, J.M. (2006) "Sex and hormonal cycle differences in rat brain levels of pain-related cannabimimetic lipid mediators" *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**: 349–358.
- Brown, M.E., Anton, R.F., Malcolm, R. y Ballenger, J.C. (1988) "Alcohol detoxification and withdrawal seizures: clinical support for a kindling hypothesis" *Biol Psychiatry*. **23(5)**: 507-14.
- Boyce-Rustay, J.M. y Holmes, A. (2006) "Ethanol-related behaviors in mice lacking the NMDA receptor NR2A subunit" *Psychopharmacology (Berl)*. **187 (4)**: 455-466.
- Brown, A.J. (2007) "Novel cannabinoid receptors" *Br J Pharmacol*. **152(5)**: 567-75.
- Cagetti, E., Liang, J., Spigelman, I. y Olsen, R.W. (2003) "Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors" *Molecular Pharmacology* **63**:53–64.
- Calignano A., La Rana G., Giuffrida A. y Piomelli D. (1998) "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids" *Nature* **394 (6690)**:277-81.
- Capasso, R., Izzo, A. A., Fezza, F., Pinto, A., Capasso, F., Mascolo, N. y Di Marzo, V. (2001) "Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice" *Br. J. Pharmacol.* **134**, 945–950.
- Cardinal, R.N., Parkinson, J.A., Hall, J. y Everitt, B.J. (2002) "Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex" *Neurosci Biobehav Rev.* **26(3)**:321-52.
- Carpenter-Hyland, E.P., Woodward, J.J. y Chandler, L.J. (2004) "Chronic Ethanol Induces Synaptic But Not Extrasynaptic Targeting of NMDA Receptors" *The Journal of Neuroscience* **24(36)**:7859-7868.
- Caulfield, M.P. y Brown, D.A. (1992) "Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108–15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism" *Br J Pharmacol* **106**: 231–232.
- Chandler, L.J., Sutton, G., Norwood, D., Sumners, C. y Crews, F.T. (1997) "Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons" *Mol Pharmacol.* **51(5)**: 733-40.

- Chandler, L.J., Harris, R.A. y Crews, F.T. (1998) "Ethanol tolerance and synaptic plasticity". *TRENDS in Pharmacological Sciences* **19**: 491-495.
- Chaperon, F., Soubrié, P., Puech, A.J. y Thiebot, M.H. (1998) "Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats" *Psychopharmacology (Berl.)* **135**: 324-332.
- Cheer, J.F., Marsden, C.A., Kendall, D.A. y Mason, R. (2000) "Lack of response suppression follows repeated ventral tegmental cannabinoide administration: an in vitro electrophysiological study". *Neuroscience* **99**: 661-667.
- Chen, J., Lee, C.T., Errico, S., Deng, X., Cadet, J.L. y Freed, W.J. (2005) "Protective effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol against N-methyl-d-aspartate-induced AF5 cell death" *Brain Res Mol Brain Res.* **134(2)**:215-25.
- Chen, W.J., Loh, E.W., Hsu, Y.P., Chen, C.C., Yu, J.M. y Cheng, A.T. (1996) "Alcohol-metabolizing genes and alcoholism among Taiwanese Han men: independent effect of ADH2, ADH3 and ALDH2." *Br J Psychiatry* **168**: 762-767.
- Chen, X., Michaelis, M.L. y Michaelis, E.K. (1997) "Effects of chronic ethanol treatment on the expression of calcium transport carriers and NMDA/glutamate receptor proteins in brain synaptic membranes" *J Neurochem*; **69**:1559-1569.
- Chen, X., Moore-Nichols, D., Nguyen, H. y Michaelis, E.K. (1999) "Calcium influx through NMDA receptors, chronic receptor inhibition by ethanol and 2-amino-5-phosponopentanoic acid, and receptor protein expression" *J Neurochem*; **72**:1969-80.
- Choi, G., Guo, J. y Makriyannis, A. (2005) "The conformation of the cytoplasmic helix 8 of the CB1 cannabinoid receptor using NMR and circular dichroism" *Biochim. Biophys. Acta* **1668**: 1-9.
- Choi, D. W. (1992). "Excitotoxic cell death" *J. Neurobiol.* **23**: 1261-1276.
- Cippitelli, A., Bilbao, A., Gorriti, M.A., Navarro, M., Massi, M., Piomelli, D., Ciccocioppo, R. y Rodríguez de Fonseca, F. (2007) "The anandamide transport inhibitor AM404 reduces ethanol self-administration" *Eur J Neurosci.* **26(2)**: 476-86.

- Cohen, C., Perrault, G., Voltz, C., Steinberg, R. y Soubrié, P. (2002) "SR 141716, a central cannabinoid (CB1) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats" *Behavioral Pharmacology* **13**: 451-463.
- Collins, M.A., Corso, T.D. y Neafsey, E.J. (1996) "Neuronal degeneration in rat cerebrocortical and olfactory regions during subchronic "binge" intoxication with ethanol: possible explanation for olfactory deficits in alcoholics" *Alcohol Clin Exp Res.* **20(2)**:284-92.
- Collins, M.A., Zou, J. y Neafsey, E.J. (1998) "Brain damage due to episodic alcohol exposure in vivo and in vitro: furosemide neuroprotection implicates edema-based mechanism" *The FASEB Journal.* **12**:221-230.
- Colombo, G. (1997) "Basi neurobiologiche della dipendenza da alcohol". En: *Medicina delle Tossicodipendenze*. Anno V. Numero 1-2/1997 (14-15). Pp. 31-33.
- Colombo, G., Agabio, R., Fa, M., Guano, L., Lobina, C., Loche, A., Reali, R. y Gessa, G.L. (1998) "Reduction of voluntary ethanol intake in ethanol-preferring sP rats by the cannabinoid antagonist SR 141716A". *Alcohol & Alcoholism* **33 (2)**:126-30.
- Colombo, G., Agabio, R., Carai, M.A., Lobina, C., Pani, M., Reali, R., Addolorato, G. y Gessa, G.L. (2000) "Ability of baclofen in reducing alcohol intake and withdrawal severity. I. Preclinical evidence". *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **24**: 58-66.
- Colombo, G., Serra, S., Brunetti, G., Atzori, G., Pani, M., Vacca, G., Addolorato, G., Froestl, W., Carai, M.A. y Gessa, G.L. (2002a) "The GABA_B receptor agonists baclofen and CGP 44532 prevent acquisition of alcohol drinking behaviour in alcohol-preferring rats". *Alcohol & Alcoholism* **37**: 499-503.
- Colombo, G., Serra, S., Brunetti, G., Gómez, R., Melis, S., Vacca, G., Carai, M.A. y Gessa, G.L. (2002b) "Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats". *Psychopharmacology* **159**: 181-187.
- Colombo, G., Vacca, G., Serra, S., Brunetti, G., Carai, M.A. y Gessa, G.L. (2003) "Baclofen suppresses motivation to consume alcohol in rats". *Psychopharmacology.* **167**: 221-224.
- Colombo, G., Serra, S., Vacca, G., Gessa, G.L. y Carai, M.A. (2004a) "Suppression by baclofen of the stimulation of alcohol intake induced by morphine and WIN 55,212-2 in alcohol-preferring rats" *European Journal of Pharmacology* **492**: 189-193.

- Colombo, G., Vacca, G., Serra, S., Carai, M.A.M. y Gessa, G.L. (2004b) "Suppressing effect of the cannabinoid CB₁ receptor antagonist, SR 141716, on alcohol's motivational properties in alcohol-preferring rats" *European Journal of Pharmacology* **498**: 119-123.
- Colombo, G., Serra, S., Vacca, G., Carai, M.A. y Gessa, G.L. (2005) "Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies" *Pharmacol Biochem Behav.* **81(2)**: 369-80.
- Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D. y Giagnoni, G. (2002) "Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat" *Br. J. Pharmacol.* **135**, 181-187
- Correa, F., Mestre, L., Molina-Holgado, E., Arevalo-Martin, A., Docagne, F., Romero, E., Molina-Holgado, F., Borrell, J. y Guaza, C. (2005) "The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation" *Mini Rev Med Chem* **5**: 671-675.
- Correa, F., Docagne, F., Mestre, L., Loría, F., Hernangómez, M., Borrell, J. y Guaza, C. (2007) "Cannabinoid system and neuroinflammation: implications for multiple sclerosis" *Neuroimmunomodulation* **14(3-4)**: 182-7.
- Corso, T.D., Mostafa, H.M., Collins, M.A. y Neafsey, E.J. (1998) "Brain neuronal degeneration caused by episodic alcohol intoxication in rats: effects of nimodipine, 6,7-dinitro-quinoxaline-2,3-dione, and MK-801" *Alcohol Clin Exp Res.* **22(1)**:217-24.
- Cossu, G., Ledent, C., Fattore, L., Imperato, A., Bohme, G.A., Parmentier, M. y Fratta, W. (2001) "Cannabinoid CB₁ receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse" *Behavioral Brain Resesearch* **118**: 61-65.
- Cota, D. (2008) "Role of the endocannabinoid system in energy balance regulation and obesity. *Front Horm Res.* **36**: 135-45.
- Cowen, M.S., Chen, F. y Lawrence, A.J. (2004) "Neuropeptides: implications foralcoholism" *J. Neurochem.* **89**, 273-285.
- Cravatt, B.F. y Lichtman, A.H. (2004) "The endogenous cannabinoide system and its role in nociceptive behaviour" *The Journal of Neurobiology* **61 (1)**: 149-160.
- Cruz, A.P., Frei, F. y Graeff, F.G (1994) "Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **49**: 171-176.

- Cunningham, C.L., Howard, M.A., Gill, S.J., Rubinstein, M., Low, M.J. y Grandy, D.K. (2000) "Ethanol-conditioned place preference is reduced in dopamine D₂ receptor-deficient mice". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **67**: 693-699.
- Dahchour, A., De Witte, Ph., Bolo, N., Nédélec, J.F., Durban, P. y Macher, J.P. (1998) "Central effect of acamprosate. Part 1. Acamprosate blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate during ethanol withdrawn rats" *Psychiat Res Neuroimag* **82**:107-14.
- Dahchour, A. y De Witte, P. (2000) "Taurine blocks the glutamate increase in the nucleus accumbens microdialysate of ethanol-dependent rats" *Pharmacol Biochem Behav.* **65(2)**:345-50.
- Dahchour A, De Witte P. (2003) "Excitatory and inhibitory amino acid changes during repeated episodes of ethanol withdrawal: an in vivo microdialysis study" *Eur J Pharmacol.* **459(2-3)**:171-8.
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N. y Robbins, T.W. (2004) "Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates" *Neurosci Biobehav Rev.* **28(7)**:771-84.
- De Cabo C., Pujol A. y Viveros M.P. (1995) "Neonatally administered naltrexone affects several behavioral responses in adult rats of both genders". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **50**: 277-86.
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Davis, J.B., Pertwee, R.G. y Di Marzo, V. (2000) "Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity" *FEBS Lett.* **483**: 52-6.
- De Petrocellis, L., Bisogno, T., Maccarrone, M., Davis, J.B., Finazzi-Agro, A. y Di Marzo, V. (2001). The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J. Biol. Chem.* **276**: 12856-63.
- De Petrocellis, L., Cascio, M.G. y Di Marzo, V. (2004) "The endocannabinoid system: a general view and latest additions". *British Journal of Pharmacology* **141**: 765-774.
- De Vries, T.J. y Schoffelmeer, A.N.M. (2005) "Cannabinoid CB₁ receptors control conditioned drug seeking" *TRENDS in Pharmacological Sciences* **26**:420-6.
- De Witte, P., Pinto, E., Ansseau, M. y Verbanck, P. (2003) "Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **27**: 189-197.

- De Witte, P. (2004) "Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory aminoacids causes craving for ethanol" *Addictive Behaviors* **29**: 1325-1339.
- Dean, B., Sundram, S., Bradbury, R., Scarr, E. y Copolov, D. (2001) "Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use" *Neuroscience* **103**: 9-15.
- del Olmo, N., Miguéns, M., Higuera-Matas, A., Torres, I., García-Lecumberri, C., Solís, J.M. y Ambrosio, E. (2006) "Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behaviour" *Brain Res.* **1116(1)**:120-6.
- Deroche-Gamonet, V., Le moal, M., Piazza, P.V. y Soubrié, P. (2001) "SR141716, a CB1 receptor antagonist, decreases the sensitivity to the reinforcing effects of electrical brain stimulation in rats". *Psychopharmacology* **157**: 254-259.
- Deutsch, D., Lin, S., Hill, W., Morse, K., Salehani, D., Arreaza, G. et al. (1997) "Fatty Acid Sulfonyl Fluorides Inhibit Anandamide Metabolism And Bind To The Cannabinoid Receptor" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 217-21.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S. y Howlett, A.C. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain" *Molecular Pharmacology* **34**: 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. y Mechoulam, R. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor" *Science* **258**: 1946-9.
- Devaud, L.L., Smith, F.D., Grayson, D.R. y Morrow, A.L. (1995) "Chronic ethanol consumption differentially alters the expression of γ -aminobutyric acid A receptor subunit mRNAs in rat cerebral cortex: competitive, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis" *Molecular Pharmacology* **48**:861-868.
- Devine, D.P. y Wise, R.A. (1994) "Self-administration of morphine, DAMGO and DPDPE into the ventral tegmental area of rats" *The Journal of Neuroscience* **14**: 1978-1984.
- Dewey, W.L. (1986) "Cannabinoid pharmacology" *Pharmacol Rev.* **38(2)**:151-78.
- Di Chiara, G. (1997) "Neurotransmitter review: Alcohol and dopamine" *Alcohol Health & Research World* **21 (2)**: 108-114.

- Di Chiara, G. e Imperato, A. (1988) "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**: 5274-5278.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C. y Piomelli, D. (1994) "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons" *Nature* **372 (6507)**: 686-691.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. y De Petrocellis, L. (1998) "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action" *TRENDS in Neuroscience* **21**: 521-528.
- Di Marzo, V., Melck, D., Orlando, P., Bisogno, T., Zagoory, O., Bifulco, M., Vogel, Z., De Petrocellis, L. (2001) "Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells" *Biochem J.* **358**: 249-55.
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. y Bisogno, T. (2002) "Anandamide receptors" *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **66**: 377-391.
- Di Marzo, V. y Matías, I. (2005) "Endocannabinoid control of food intake and energy balance" *Nature Neuroscience* **8 (5)**: 585-589.
- Diana, M., Brodie, M., Muntoni, A., Puddu, M.C., Pillolla, G., Steffensen, S., Spiga, S. y Little, H.J. (2003). "Enduring effects of chronic ethanol in the CNS: Basis for alcoholism" *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **27 (2)**: 354-361.
- Docagne, F., Muñetón, V., Clemente, D., Ali, C., Loría, F., Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Vivien, D. y Guaza, C. (2007) "Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation" *Mol Cell Neurosci.* **34(4)**: 551-61.
- Docagne, F., Mestre, L., Loría, F., Hernangómez, M., Correa, F. y Guaza, C. (2008) "Therapeutic potential of CB2 targeting in multiple sclerosis" *Expert Opin Ther Targets.* **12(2)**:185-95.
- Document de référence* 2004, pp. 46-47. En: http://en.sanofi-aventis.com/rd/p_research.asp
- Dodd, P.R., Beckmann, A.M., Davidson, M.S. y Wilce, P.A. (2000) "Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism" *Neurochemistry International* **37**: 509-533.

- Domínguez, G., Vicentic, A., Del Giudice, E.M., Jaworski, J., Hunter, R.H. y Kuhar, M.J. (2004) "CART peptides: modulators of mesolimbic dopamine, feeding, and stress". *Annals of the New York Academy of Sciences* **1025**: 363-369.
- D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y.T., Braley, G., Gueorguieva, R. y Krystal, J.H. (2004) "The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis" *Neuropsychopharmacology* **29(8)**:1558-72.
- Durán, M. y Capellà, D. (2003) "Efectos antieméticos de los cannabinoides". En: *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 93-102.
- Elphick, M.R., Satou, Y. y Satoh, N. (2003) "The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*". *Gene* **302**:95-101.
- Engleman, E.A., McBride, W.J., Wilber, A.A., Shaikh, S.R., Eha, R.D., Lumeng, L., Li, T.K. y Murphy, J.M. (2000) "Reverse microdialysis of a dopamine uptake inhibitor in the nucleus accumbens of alcohol-preferring rats: effects on dialysate dopamine levels and ethanol intake" *Alcohol Clin Exp Res.* **24(6)**:795-801.
- Estruch, R. (2002) "Efectos del alcohol en la fisiología humana" En: "Monografía del alcohol" Editor: Antoni Gual. *Adicciones*, Vol. 14, suplemento 1. Pp:43-61.
- Fadda F. y Rossetti Z.L. (1998) "Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration" *Prog Neurobiol.* **56 (4)**: 385-431.
- Farquhar-Smith, W. P., Jaggar, S. I. y Rice, A. S. (2002) "Attenuation of nerve growth factor-induced visceral hyperalgesia via cannabinoid CB(1) and CB(2)-like receptors" *Pain* **97**, 11-21.
- Fernández-López, D., Martínez-Orgado, J., Nuñez, E., Romero, J., Lorenzo, P., Moro, M.A. y Lizasoain, I. (2006) "Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats" *Pediatr Res.* **60(2)**:169-73.
- Fernández-Ruiz, J.J., Berrendero, F., Hernández, M.L. y Ramos, J.A. (2000) "The endogenous cannabinoid system and brain development" *TRENDS in Neurosciences* **23 (1)**: 14-20.

- Fernández-Ruiz, J.J., Lastres-Becker, I., Cabranes, A., González, S. y Ramos, J.A. (2002) "Endocannabinoids and basal ganglia functionality" *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **66 (2-3)**: 257-67.
- Fernández-Ruiz, J.J., Gómez, M., Hernández, M.L., De Miguel, R. y Ramos, J.A. (2004b) "Cannabinoids and gene expression during brain development" *Neurotoxicology Research* **6 (5)**: 389-401.
- Fernández-Ruiz, J.J., González, S., Sagredo, O., De Miguel, R. y Ramos, J.A. (2004a) "Endocannabinoids and alcohol addiction" *Recent Advances in Pharmacology and Physiology of Cannabinoids*: 237-246.
- Fernández-Ruiz, J. y Gonzalez, S. (2005) "Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia" *Handb. Exp. Pharmacol.* **168**: 479-507.
- Ferreira, V.M., Frausto, S., Browning, M.D., Savage, D.D., Morato, G.S. y Valenzuela, C.F. (2001) "Ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus: lack of an effect of a long-term ethanol exposure paradigm" *Alcohol Clin Exp Res.* **25(10)**: 1536-41.
- Ferrer, B., Bermúdez-Silva, F.J., Bilbao, A., Alvarez-Jaimes, L., Sanchez-Vera, I., Giuffrida, A., Serrano, A., Baixeras, E., Khaturia, S., Navarro, M., Parsons, L.H., Piomelli, D. y Rodríguez de Fonseca, F. (2007) "Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol" *Biochem J.* **404(1)**: 97-104.
- Figlewicz, D.P., Evans, S.B., Murphy, J., Hoen, M. y Baskin, D.G. (2003) "Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat" *Brain Research* **964**: 107-115.
- File, S.E. (1992) "Behavioral detection of anxiolytic action". En: *Experimental approaches to anxiety and depression*. Editado por Elliot J.M., Heal J., Marsden C.A. pp. 25-44. Wiley, New York.
- Floyd, D.W., Jung, K.Y. y McCool, B.A. (2003) "Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdala neurons" *J Pharmacol Exp Ther*, **307**:1020-9.
- Follesa, P. y Ticku, M.K. (1995) "Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain" *Brain Res Mol Brain Res.* **29(1)**: 99-106.

- Follesa, P. y Ticku, M.K. (1996) "Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture" *J Biol Chem.* **271(23)**:13297-9.
- Forman, S. A. y Miller, K. W. (1989) "Molecular sites of anesthetic action in postsynaptic nicotinic membranes" *Trends in Pharmacological Sciences* **10**: 447-452.
- Fowler, C.J. (2003) "Plant-derived, synthetic and endogenous cannabinoids as neuroprotective agents. Non-psychoactive cannabinoids, 'entourage' compounds and inhibitors of N-acyl ethanolamine breakdown as therapeutic strategies to avoid psychotropic effects" *Brain Res Brain Res Rev.* **41(1)**:26-43.
- Franklin, A., Parmentier-Batteur, S., Walter, L., Greenberg, D.A. y Stella, N. (2003) "Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility" *J Neurosci.* **23(21)**: 7767-75.
- Freedland, C.S., Sharpe, A.L., Samson, H.H. y Porrino, L.J. (2001) "Effects of SR 141716 on ethanol and sucrose self-administration" *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **25**: 277-282.
- Froehlich, J.C. (1997) "Neurotransmitter review: Opioid peptides" *Alcohol Health & Research World* **21(2)**: 132-136.
- Fu, J.; Gaetani, S.; Oveisi, F.; Lo Verme, J.; Serrano, A.; Rodríguez de Fonseca, F.; Rosengarth, A.; Luecke, L.; Di Giacomo, B.; Tarzia, G. y Piomelli, D. (2003) "Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha" *Nature* **425**:90-93.
- Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E. y Piomelli, D. (2005) "Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats" *Neuropharmacology.* **48(8)**: 1147-53.
- Fu, J., Astarita, G., Gaetani, S., Kim, J., Cravatt, B.J., Mackie, K. y Piomelli, D. (2007) "Food Intake Regulates Oleoylethanolamide Formation and Degradation in the Proximal Small Intestine" *J. Biol. Chem.* **282 (2)**: 1518-1528.
- Funk, C.K., O'Dell, L.E., Crawford, E.F. y Koob, G.F. (2006) "Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats" *Journal of Neuroscience* **26**: 11324-11332.
- Funk, C.K. y Koob, G.K. (2007) "A CRF₂ agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats" *Brain Research* **1155**:172-8.

- Gabriel, K.I., Glavas, M.M., Ellis, L. y Weinberg, J. (2005) "Postnatal handling does not normalize hypothalamic corticotropin-releasing factor mRNA levels in animals prenatally exposed to ethanol" *Dev. Brain Res.* **157**, 74-82.
- Gainetdinov, R.R., Jones, S.R. y Caron, M.G. (1999) "Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice" *Biological Psychiatry* **46**: 303-311.
- Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G. y Casellas, P. (1995) "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations" *Eur. J. Biochem.* **232**: 54-61.
- Gallate, J.E. "Preclinical identification of novel treatments for alcohol craving using the "beer model" in rats". Tesis Doctoral. School of Psychology, University of Sydney, December 2004.
- Gallate, J.E. y McGregor, I.S. (1999) "The motivation for beer in rats: effects of ritanserin, naloxone and SR 141716" *Psychopharmacology (Berl)*. **142 (3)**:302-8.
- Gallate, J.E., Saharov, T., Mallet, P.E. y McGregor, I.S. (1999) "Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist" *European Journal of Pharmacology* **370 (3)**: 233-40.
- Gallate, J.E., Morley, K.C., Ambermoon, P. y McGregor, I. (2003) "The consequences for beer in rats: acute ansiolytic and ataxic effects and withdrawal-induced anxiety" *Psychopharmacology* **166**: 51-60.
- Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gómez del Pulgar, T., Velasco, G. y Guzmán, M. (2002) "Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB₁ cannabinoid receptor" *Molecular Pharmacology* **62**: 1385-1392.
- Gammon, C.M., Freeman, G.M. Jr., Wie, W., Petersen, S.L. y Wetsel, W.C. (2005) "Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone secretion by cannabinoids" *Endocrinology* **146(10)**: 4491-9.
- Gaoni, Y. y Mechoulam, R. (1964) "Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish" *Journal of the American Chemical Society* **86**: 1646.
- García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J.A., Mechoulam, R., Fernández-Ruiz, J. (2007) "Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties" *Brain Res.* **1134(1)**: 162-70.

- García de Marina, A. y Del Castillo, B. (1988) "Cromatografía líquida de alta resolución" Ed. Limusa, México, D.F.
- Gatch, M.B., Wallis, C.J. y Lal, H. (2000) "Effects of ritanserin on ethanol withdrawal-induced anxiety in rats" *Alcohol* **21**: 11-17.
- Gerard, C., Mollereau, C., Vassart, G. y Parmentier, M. (1991) "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis". *Biochemical Journal* **279**: 129-134.
- Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L. y Mereu, G. (1985) "Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons of the ventral tegmental area" *Brain Research* **384**: 201-203.
- Gessa, G.L., Serra, S., Vacca, G., Carai, M. y Colombo, G. (2005) "Suppressing effect of the cannabinoide CB₁ receptor antagonist, SR 147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats" *Alcohol & Alcoholism* **40 (1)**: 46-53.
- Gilbert, G.L., Kim, H.J., Waataja, J.J. y Thayer, S.A. (2007) "Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity" *Brain Res.* **1128(1)**:61-9.
- Giuffrida, A., Leweke, F.M., Gerth, C.W., Schreiber, D., Koethe, D., Faulhaber, J., Klosterkotter, J. y Piomelli, D. (2004) "Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms" *Neuropsychopharmacology* **29**: 2108-2114.
- Goeders, N.E. (1997) "A neuroendocrine role in cocaine reinforcement" *Psychoneuroendocrinology*. **22(4)**:237-59.
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A. y Uhl, G.R. (2006) "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain" *Brain Res.* **1071**: 10-23.
- Goicoechea, C. y Martin, M.I. (2003) "Cannabinoides y glaucoma" En: *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 201-208.
- Gonzales, R.A. y Jaworski, J.N. (1997). "Neurotransmitter review: Alcohol and glutamate". *Alcohol Health & Research World* **21 (2)**: 120-127.

- Gonzales, R.A. y Weiss, F. (1998) "Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens" *The Journal of Neuroscience* **18**: 10663-10671.
- González, S., Cascio, M.G., Fernández-Ruiz, J., Fezza, F., Di Marzo, V. y Ramos, J.A. (2002b) "Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine". *Brain Research* **954** (1): 73-81.
- González, S., Fernández-Ruiz, J., Spargaglione, V., Parolaro, D. y Ramos, J.A. (2002a) "Chronic exposure to morphine, cocaine or ethanol in rats produced different effects in brain cannabinoid CB1 receptor binding and mRNA levels". *Drug and Alcohol Dependence* **66**: 77-84.
- González, S., Schmid, P.C., Fernández-Ruiz, J.J., Krebsbach, R., Schmid, H.H. y Ramos, J.A. (2003) "Region-dependent changes in endocannabinoid transmission in the brain of morphine-dependent rats". *Addiction Biology* **8** (2): 159-66.
- González, S., Valenti, M., De Miguel, R., Fezza, F., Fernández-Ruiz, J.J., Di Marzo, V. y Ramos, J.A. (2004) "Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse". *British Journal of Pharmacology* **143** (4): 455-64.
- Graeff, F.G., Audi, E.A., Almeida, S.S., Graeff E.O. y Hunziker M.H. (1990) "Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **14**: 501-6.
- Grant, K.A., Valverius, P., Hudspith, M. y Tabakoff, B. (1990) "Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex" *Eur J Pharmacol.* **176**(3):289-96.
- Grant, K.A., Snell, L.D., Rogawski, M.A., Thurkauf, A. y Tabakoff, B. (1992) "Comparison of the effects of the uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonist (+)-5-aminocarbonyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine (ADCI) with its structural analogs dizocilpine (MK-801) and carbamazepine on ethanol withdrawal seizures" *J Pharmacol Exp Ther.* **260**(3):1017-22.
- Green, A.R. y Shuaib, A. (2006) "Therapeutic strategies for the treatment of stroke" *Drug Discov Today.* **11**(15-16): 681-93.
- Griebel, G., Stemmelin, J. y Scatton, B. (2004) "Effects of the cannabinoide CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents" *Biological Psychiatry* **57**: 261-267.

- Gulya, K., Grant, K.A., Valverius, P., Hoffman, P.L. y Tabakoff, B. (1991) "Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal" *Brain Res.* **547(1)**:129-34.
- Guzmán, M. (2003) "Cannabinoids: potential anticancer agents" *Nature Reviews Cancer* **3**: 745-755.
- Guzman, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blazquez, C., y Piomelli, D. (2004) "Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha)" *J. Biol. Chem.* **279**, 27849–27854
- Haller, J., Bakos, N., Szirmay, M., Ledent, C., Freund, T.F. (2002) "The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB₁ cannabinoid receptor on anxiety" *European Journal of Neuroscience* **16**: 1395-8.
- Haller, J., Varga, B., Ledent, C. y Freund, T.F. (2004) "CB₁ cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB₁-specific agents" *Behav. Pharmacol.* **15**, 299-304.
- Harris, B.R., Gibson, D.A., Prendergast, M.A., Blanchard, J.A., Holley, R.C., Hart, S.R., Scotland, R.L., Foster, T.C., Pedigo, N.W. y Littleton, J.M. (2003) "The neurotoxicity induced by ethanol withdrawal in mature organotypic hippocampal slices might involve cross-talk between metabotropic glutamate type 5 receptors and N-methyl-D-aspartate receptors" *Alcohol Clin Exp Res.* **27(11)**: 1724-35.
- Hamelink, C., Hampson, A., Wink, D.A., Eiden, L.E. y Eskay, R.L. (2005) "Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity" *J Pharmacol Exp Ther.* **314(2)**: 780-8.
- Hampson, A.J., Bornheim, L.M., Scanziani, M., Yost, C.S., Gray, A.T., Hansen, B.M., Lenoudakis, D.L. y Bickler, P.E. (1998) "Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission" *J. Neurochem.* **70**: 671-676.
- Hampson, R.E., Mu, J. y Deadwyler, S.A. (2000) "Cannabinoid and κ opioid receptors reduce potassium K current via activation of Gs proteins in cultured hippocampal neurons" *J Neurophysiol* **84**: 2356–2364.
- Hanus, L., Abu-Lafi, S., Frider, E., Breuer, A., Vogel, Z., Shalev, D.E., Kustanovich, I. y Mechoulam, R. (2001) "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 14228-14223.

- Hansen, H.S., Lauritzen, L., Strand, A.M., Vinggaard, A.M. Frandsen, A. Y Schousboe, A. (1997) "Characterization of glutamate-induced formation of N-acylphosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine in cultured neocortical neurons" *J. Neurochem.* **69** :753–761.
- Hansen, H.S., Moesgaard, B., Petersen, G., Hansen, H.H. (2002) "Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines" *Pharmacol. Ther.* **95**, 119–126.
- Hansson, A.C., Bermúdez-Silva, F.J., Malinen, H., Hyytiä, P., Sanchez-Vera, I., Rimondini, R., Rodriguez de Fonseca, F., Kunos, G., Sommer, W.H. y Heilig, M. (2007) "Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference" *Neuropsychopharmacology*. **32(1)**: 117-26.
- Heinrichs, S.C. y Koob, G.F., (2004) "Corticotropin-releasing factor in brain: a role in activation, arousal, and affect regulation" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 427-440.
- Heinz, A., Mann, K., Weinberger, D.R. y Goldman, D. (2001) "Serotonergic dysfunction, negative mood states, and response to alcohol". *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **24 (4)**: 487-495.
- Henniger, M.S., Wotjak, C.T. y Holter, S.M. (2003) "Long-term voluntary ethanol drinking increases expression of NMDA receptor 2B subunits in rat frontal cortex" *Eur J Pharmacol*; **470**:33–6.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R. y Rice, K.C. (1991) "Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study". *The Journal of Neuroscience* **11**: 563-83.
- Herrera, D.G., Yague, A.G., Johnsen-Soriano, S., Bosch-Morell, F., Collado-Morente, L., Muriach, M., Romero, F.J. y Garcia-Verdugo, J.M. (2003) "Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100(13)**: 7919-24.
- Hoffman, A.F., Oz, M., Caulder, T. y Lupica, C.R. (2003a) "Functional localization of cannabinoid receptors and endogenous cannabinoid production in distinct neuron populations of the hippocampus". *European Journal of Neuroscience* **18**: 524-534.
- Hoffman, A.F., Riegel, A.C. y Lupica, C.R. (2003b) "Functional tolerance and blockade of long-term depression at synapses in the nucleus accumbens after chronic cannabinoid exposure". *The Journal of Neuroscience* **23**: 4815-4820.

- Hoffman, P.L., Rabe, C.S., Moses, F. y Tabakoff, B. (1989) "N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production". *Journal of Neurochemistry* **52**: 1937-1940.
- Holter, S.M., Engelmann, M., Kirschke, C., Liebsch, G., Landgraf, R. y Spanagel, R. (1998) "Long-term ethanol self-administration with repeated ethanol deprivation episodes changes ethanol drinking pattern and increases anxiety-related behaviour during ethanol deprivation in rats" *Behav. Pharmacol.* **9**, 41-48.
- Houston, D. B., Evans, D. M., Howlett, A. C. y Melvin, I. S. (1991) "[3H]-CP-55,940 binding to the cannabinoid receptor" *Du Pont Biotech. Update* **6**, 21-27.
- Howlett, A.C., Bidaut-Russell, M., Devane, W.A., Melvin, L.S., Johnson, M.R. y Herkenham, M. (1990) "The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization" *Trends Neurosci.* **13(10)**: 420-3.
- Howlet, A.C. (2004) "Efficacy in CB₁ receptor-mediated signal transduction" *British Journal of Pharmacology* **142**: 1209-1218.
- Houchi, H., Babovic, D., Pierrefiche, O., Ledent, C., Daoust, M. y Naassila, M. (2005) "CB₁ receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D₂ receptors" *Neuropsychopharmacology*. **30(2)**: 339-49.
- Hu, X.J., Follesa, P. y Ticku, M.K. (1996) "Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons" *Brain Res Mol Brain Res.* **36(2)**:211-8.
- Hu, X.J. y Ticku, M.K. (1995) "Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons" *Brain Res Mol Brain Res.* **30(2)**:347-56.
- Hu, X.J. y Ticku, M.K. (1997) "Functional characterization of a kindling-like model of ethanol withdrawal in cortical cultured neurons after chronic intermittent ethanol exposure" *Brain Res.* **767(2)**:228-34.
- Huang, S.M., Bisogno, T., Petros, T.J., Chang, S.Y., Zavitsanos, P.A., Zipkin, R.E., Sivakumar, R., Coop, A., Maeda, D.Y., De Petrocellis, L., Burstein, S., Di Marzo, V. y Walker, J.M. (2001) "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR₁ receptors" *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* **99**: 8400-8405.

- Huestis, M.A., Gorelick, D.A., Heishman, S.J., Preston, K.L., Nelson, R.A., Moolchan, E.T. y Frank, R.A. (2001) "Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoide receptor antagonist SR 141716" *Archives of General Psychiatry* **58**: 322-328.
- Huffman, J.W. (2005) "CB2 receptor ligands" *Mini Rev Med Chem.* **5(7)**: 641-9.
- Hungund, B.L., y Basavarajappa, B.P. (2000a) "Distinct differences in the CB1 receptor binding in the rat brain of C57BL/6 and DBA/2 mice, selected for their differences in voluntary ethanol consumption" *Journal of Neuroscience Research* **60**: 122-128.
- Hungund, B.L. y Basavarajappa, B.S. (2000b) "Are anandamide and cannabinoid receptors involved in ethanol tolerance? A review of the evidence" *Alcohol Alcohol.* **35**: 126-133.
- Hungund, B.L. Basavarajappa, B.S. Vadasz, C. Kunos, G., F. Rodríguez de Fonseca, Colombo, G. Serra, S. Parsons, L. y Koob, G.F. (2002) "Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system" *Alcohol Clin. Exp. Res.* **26**: 565-574.
- Hungund, B.L., Szakall, I., Adam, A., Basavarajappa, B.P. y Vadasz, C. (2003) "Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens" *Journal of Neurochemistry* **84**: 698-704.
- Hungund, B.L., Vinod, K.Y., Kassir, S.A., Basavarajappa, B.S., Yalamanchili, R., Cooper, T.B., Mann, J.J. y Arango, V. (2004) "Upregulation of CB1 receptors and agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding in the prefrontal cortex of depressed suicide victims" *Mol Psychiatry.* **9(2)**: 184-90.
- Ikemoto, S., McBride, W.J., Murphy, J.M., Lumeng, L. y Li, T.K. (1997) "6-OHDA-lesions of the nucleus accumbens disrupt the acquisition but not the maintenance of ethanol consumption in the alcohol-preferring P line of rats" *Alcohol Clin Exp Res.* **21(6)**:1042-6.
- Ingram, S.L., Prasad, B.M. y Amara, S.G. (2002) "Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons". *Nature Neuroscience* **5**: 971-978.
- Iorio, K.R., Reinlib, L., Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (1992) "Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function" *Mol Pharmacol*, **41**:1142-8.
- Ishac, E.J., Jiang, L., Lake, K.D., Varga, K., Abood, M.E. y Kunus, G. (1996) "Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves" *Br. J. Pharmacol.* **118**: 2023-8.

- Ishii, T., Moriyoki, K. y Sugihara, H. (1993) "Molecular characterization of the family of NMDA receptor subunits" *J Biol Chem* **268**, 2836– 2843.
- Ishiguro, H., Iwasaki, S., Teasent, L., Higuchi, S., Horiuchi, Y., Saito, T., Arinami, T. y Onaivi, E.S. (2007) "Involvement of cannabinoid CB2 receptor in alcohol preference in mice and alcoholism in humans" *Pharmacogenomics J.* **7**(6): 380-5.
- Jacobs, W.A. (1987). "o-Phthalaldehyde-sulfite derivatization of primary amines for liquid chromatography-electrochemistry" *Journal of Chromatography* **392**: 435-441.
- Johnson, B.A. y Ait-Daoud, N. (2000) "Neuropharmacological treatments for alcoholism: scientific basis and clinical findings". *Psychopharmacology* **149**: 327-344.
- Johnson, B.A., Roache, J.D., Javors, M.A., DiClemente, C.C., Cloninger, C.R., Prihoda, T.J., Bordnick, P.S., Ait-Daoud, N. y Hensler, J. (2000) "Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients: a randomized controlled trial". *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **284**: 963-971.
- Johnson, S.W. y North, R.A. (1992) "Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons". *Journal of Neuroscience* **12**: 483-488.
- Johnston, A.L. y File, S.E. (1991) "Sex differences in animal tests of anxiety". *Physiology and Behavior* **49**: 247-50.
- Kalivas, W.P y McFarland, K. (2003) "Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior" *Psychopharmacology* **168**: 44-56.
- Kalluri, H.S.G. y Ticku, M.K. (2002a) "Ethanol-mediated inhibition of mitogen-activated protein kinase phosphorylation in mouse brain" *European Journal of Pharmacology* **439**:53–58.
- Kalluri, H.S.G. y Ticku, M.K. (2002b) "Role of GABAA receptors in the ethanol-mediated inhibition of extracellular signal-regulated kinase" *European Journal of Pharmacology* **451**:51–54.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., Duranti, A., Tontini, A. et al. (2003) "Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis" *Nat. Med.* **9**: 76-81.

- Keläi, S., Aïssi, F., Lesch, K.P., Cohen-Salmon, C., Hamon, M. y Lanfumey, L. (2003) "Alcohol intake alter serotonin transporter inactivation in mice". *Alcohol & Alcoholism* **38** (4): 386-389.
- Kelley, A.E. (2004) "Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning" *Neurosci Biobehav Rev.* **27**(8):765-76.
- Kempe, K., Hsu, F.F., Bohrer, A. y Turk, J. (1996) "Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue" *J. Biol. Chem.* **271**, 17287–17295.
- Kim, S.H., Won, S.J., Mao, X.O., Jin, K. y Greenberg, D.A. (2005) "Involvement of protein kinase A in cannabinoid receptor-mediated protection from oxidative neuronal injury" *J Pharmacol Exp Ther.* **313**(1): 88-94.
- Kirkham, T.C. y Tucci, S.A. (2006) "Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity" *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **5**: 272-92.
- Klein, T.W. (2005) "Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics" *Nat Rev Immunol* **5**: 400– 411.
- Klein, T.W. y Cabral, G.A. (2006) "Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells" *J Neuroimmune Pharmacol.* **1**(1):50-64.
- Koh, J. Y. y Choi, D. W. (1987). "Quantitative determination of glutamate-mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay" *J. Neurosci. Methods* **20**: 83–90.
- Koistinen, M., Tuomainen, P., Hyytiä, P. y Kiianmaa, K. (2001) "Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamine-treated rats" *Alcohol Clin Exp Res.* **25**(11):1605-12.
- Koistinen, M., Tuomainen, P., Hyytiä, P. y Kiianmaa, K. (2001) "Naltrexone suppresses ethanol intake in 6-hydroxydopamin-treated rats." *Alcoholism, clinical and experimental research* **25**: 1605-1612.
- Kokka, N., Sapp, D.W., Taylor, A.M. y Olsen, R.W. (1993) "The kindling model of alcohol dependence: similar persistent reduction in seizure threshold to pentylenetetrazole in animals receiving chronic ethanol or chronic pentylenetetrazole" *Alcoholism, clinical and experimental research* **17**(3):525–531.

- Koob, G.F. y Le Moal, M. (2001) "Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis" *Neuropsychopharmacology*. **24(2)**:97-129.
- Koob, G.F. (2003) "Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala" *Eur Neuropsychopharmacol*. **13(6)**:442-52.
- Kreek, M.J. y Koob, G.F. (1998) "Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways" *Drug Alcohol Depend*. **51(1-2)**:23-47.
- Kumari, M. y Ticku, M.K. (1998) "Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons" *J Neurochem*. **70(4)**:1467-73.
- Kumari, M. (2001) "Differential effects of chronic ethanol treatment on N-methyl-D-aspartate R1 splice variants in fetal cortical neurons" *J Biol Chem*, **276**:29764-71.
- Lallemant, F., Soubrié, P. y De Witte, P. (2001) "Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic alcohol administration combined with repeated re-exposures and withdrawals" *Alcohol & Alcoholism* **39 (6)**: 486-492.
- Lallemant, F. y De Witte, P. (2005) "Ethanol induces higher BEC in CB1 cannabinoid receptor knockout mice while decreasing ethanol preference". *Alcohol & Alcoholism* **40 (1)**: 54-62.
- Lallemant, F. y De Witte, P. (2006) "SR147778, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, suppresses ethanol preference in chronically alcoholized Wistar rats" *Alcohol*. **39(3)**: 125-34.
- Lambert, D.M. y Di Marzo, V. (1999) "The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic?" *Curr Med Chem*. **6(8)**: 757-73.
- Lambie, D.G. (1985) "Alcoholic brain damage and neurological symptoms of alcohol withdrawal--manifestations of overhydration" *Med Hypotheses*. **16(4)**: 377-88.
- Langen, B., Dietze, S. y Fink, H. (2002) "Acute effect of ethanol on anxiety and 5-HT in the prefrontal cortex of rats". *Alcohol* **27**: 135-141.
- Lastres-Becker, I. y Fernández-Ruiz, J. (2006) "An overview of Parkinson's disease and the cannabinoid system and possible benefits of cannabinoid-based treatments" *Curr Med Chem*. **13(30)**: 3705-18.

- Laviolette, S.R. y Van der Kooy, D. (2003) "Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area" *Mol Psychiatry*. **8(1)**:50-9, 9.
- Le Foll, B. y Goldberg, S.R. (2005) "Cannabinoids CB₁ receptor antagonists as promising new medications for drug dependence" *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312 (3)**: 875-883.
- Le Moal M, Stinus L, Simon H. (1979) "Increased sensitivity to (+)amphetamine self-administered by rats following meso-cortico-limbic dopamine neurone destruction" *Nature* **280(5718)**:156-8.
- Le Moal, M. y Koob, G.F. (2007) "Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives" *Eur Neuropsychopharmacol*. **17(6-7)**:377-93.
- Lê, A.D. y Shaham, Y. (2002) "Neurobiology of relapse to alcohol in rats". *Pharmacology & Therapeutics* **94**: 137-156.
- Lê, A.D., Harding, S., Juzytsch, W., Watchus, J., Shalev, U. y Shaham, Y. (2000) "The role of corticotrophin-releasing factor in stress-induced relapse to alcohol-seeking behaviour in rats". *Psychopharmacology* **150**: 317-324.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Bohme, G.A., Imprato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W. y Parmentier, M. (1999) "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice". *Science* **283**: 401-4.
- Leza, J.C. y Lorenzo, P. (2003) "Efectos cardiovasculares y broncodilatadores de los cannabinoides" En: *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 209-221.
- Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M. y Cravatt, B.F. (2006) "Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids" *Biochemistry* **45**: 4720-6.
- Lipton, S.A. y Chen, H.S. (2004) "Paradigm shift in neuroprotective drug development: clinically tolerated NMDA receptor inhibition by memantine" *Cell Death Differ*. **11(1)**:18-20.

- Liu, J., Wang, L., Harvey-White, J., Osei-Hyiaman, D., Razdan, R., Gong, Q., Chan, A.C., Zhou, Z., Huang, B.X., Kim, H.Y. y Kunos, G. (2006) "A biosynthetic pathway for anandamide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 13345-50.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M. y Wang, Y.T. (2007) "NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo" *J Neurosci.* **27(11)**:2846-57.
- López-Moreno, J.A., González-Cuevas, Rodríguez de Fonseca, R. y Navarro, M. (2004) "Long-lasting increase of alcohol relapse by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 during alcohol deprivation" *The Journal of Neuroscience* **24 (38)**: 8245-8252.
- López-Rodríguez, M.L., Viso, A., Ortega-Gutiérrez, S., Lastres-Becker, I., González, S., Fernández-Ruiz, J.J. y Ramos, J.A. (2001) "Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors" *Journal of medicinal chemistry* **44**: 4505-4508.
- Lo Verme, J., Gaetani, S., Fu, J., Oveisi, F., Burton, K., Piomelli, D. (2005) "Regulation of food intake by oleoylethanolamide" *Cell Mol Life Sci.* **62(6)**: 708-16.
- Lovinger, D.M., Witte, G. y Weight, F.F. (1989) "Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons". *Science* **243**: 1721-1724.
- Lovinger, D.M. (1997) "Neurotransmitter review: Serotonin's role in alcohol's effects on the brain". *Alcohol Health & Research World* **21 (2)**: 114-120.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.R. y Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the folin phenol reagent" *The Journal of biological chemistry* **193**: 265-275.
- Lupica, C.R., Riegel, A.C. y Hoffman, A.F. (2004) "Marijuana and cannabinoid regulation of brain reward circuits". *British Journal of Pharmacology* **143**: 227-234.
- Lupica, C.R. y Riegel, A.C. (2005) "Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: A potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction". *Neuropharmacology* **48 (8)**:1105-16.

- Maccarrone, M., Cartoni, A., Parolaro, D., Margonelli, A., Massi, P., Bari, M., Battista, N. y Finazzi-Agro A. (2002) "Cannabimimetic Activity, Binding, and Degradation of Stearoyl ethanolamide within the Mouse Central Nervous System" *Molecular and Cellular Neuroscience* **21**, 126–140.
- Mackie, K., Devane, W.A. y Hille, B. (1993) "Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells" *Mol Pharmacol* **44**:498–503.
- Mackie, K. y Hille, B. (1992) "Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma cells" *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:3825–3829.
- Magnusson, K.R., Nelson, S.E. y Young, A.B. (2002) "Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor" *Brain Res Mol Brain Res* **99**:40–45.
- Maldonado, R., Valverde, O. y Berrendero, F. (2006) "Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction" *TRENDS in Neurosciences* **29(4)**: 225-232.
- Mangieri, R.A. y Piomelli, D. (2007) "Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression" *Pharmacol Res.* **56(5)**: 360–366.
- Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D. y Fromenty, B. (2001) "Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants" *J Pharmacol Exp Ther.* **298(2)**: 737-43.
- Markey, SP., Dudding, T. y Wang, T.C. (2000) "Base- and acid- catalyzed interconversions of O-acyl- and N-acyl-ethanolamines: a cautionary note for lipid analyses". *Journal of lipid research* **41**: 657-662.
- Marsicano, G. y Lutz, B. (2006) "Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system" *J. Endocrinol. Invest.* **29**: 27-46.
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B. y Behl, C. (2002a) "Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1" *J Neurochem.* **80(3)**: 448-56.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hoffman, C., Zleglänsberger, W., Di Marzo, V. y Lutz, B. (2002b) "The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories" *Nature* **418**: 530-534.

- Martin, M., Ledent, L., Parmentier, M., Maldonado, R. y Valverde, O. (2000) "Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice" *The European journal of neuroscience* **12**: 4038-4046.
- Martin, B.R. y Wiley, J.L. (2004) "Mechanism of action of cannabinoids: how it may lead to treatment of cachexia, emesis, and pain" *The journal of supportive oncology* **2** (4):305-14.
- Martin-Fardon, R., Ciccocioppo, R., Massi, M. y Weiss, F. (2000) "Nocicpetin prevents stress-induced ethanol- but not cocaine –seeking behavior in rats". *Neuroreport* **11**: 1939-1943.
- Marutha Ravindran, C.R. y Ticku, M.K. (2006a) "Tyrosine kinase phosphorylation of GABAA receptor subunits following chronic ethanol exposure of cultured cortical neurons of mice" *Brain Research* **1086**:35–41.
- Marutha Ravindran, C.R. y Ticku, M.K. (2006b) "Tyrosine kinase phosphorylation of GABAA receptor $\alpha 1$, $\beta 2$, and $\gamma 2$ subunits following chronic intermittent ethanol (CIE) exposure of cultured cortical neurons of mice" *Neurochemical Research* **31**:1111–1118.
- Marsicano, G. y Lutz, B. (1999) "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain" *Eur J Neurosci* **11**:4213–4225.
- Marsicano, G., Moosmann, B., Hermann, H., Lutz, B. y Behl, C. (2002) "Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1" *J Neurochem* **80**:448–456.
- Masood, K., Wu, C., Brauneis, U. y Weight, F.F. (1994) "Differential ethanol sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits" *Mol Pharmacol* **45**:324–329.
- Mato, S., Rodríguez-Puertas, R., Meana, J.J. y Pazos, A. (2003) "Recientes avances en la farmacología del sistema endocannabinoide" En: *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 43-58.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C. y Bonner, T.I. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA" *Nature* **346**: 561-564.
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I. y Lolait, S.J. (1993). "Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain" *Journal of Comparative Neurology* **327**: 535-550.

- McCown, T.J. y Breese, G.R. (1990) "Multiple withdrawals from chronic ethanol "kindles" inferior collicular seizure activity: evidence for kindling of seizures associated with alcoholism" *Alcohol Clin Exp Res.* **14(3)**: 394-9.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R. y Compton, D.R. (1995) "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors". *Biochemistry & Pharmacology* **50**: 83-90.
- Mechoulam, R., Spatz, M. y Shohami, E. (2002) "Endocannabinoids and neuroprotection" *Sci STKE*. **129**:RE5.
- Merlo Pich, E., Lorang, M., Yeganeh, M., Rodriguez de Fonseca, F., Raber, J., Koob, G.F. y Weiss, F. (1995) "Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis" *Journal of Neuroscience* **15**, 5439–5447.
- Mhatre, M.C. y Ticku, M.K. (1992) "Chronic ethanol administration alters γ -amino butyric acid A receptor gene expression" *Molecular Pharmacology* **42**:415–422.
- Mhatre, M.C., Pena, G., Sieghart, W. y Ticku, M.K. (1993) "Antibodies specific for GABAA receptor alpha subunits reveal that chronic alcohol treatment down-regulates alpha-subunit expression in rat brain regions" *J Neurochem.* **61(5)**:1620-5.
- Mhatre, M.C. y Ticku, M.K. (1994) "Chronic ethanol treatment up-regulates the GABA receptor β subunit expression" *Molecular Brain Research* **23**:246–252.
- Mirshahi, T. y Woodward, J.J. (1995) "Ethanol sensitivity of heteromeric NMDA receptors: Effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg²⁺-insensitive mutants" *Neuropharmacology* **34**:347–355.
- Miller, E.K. y Cohen, J.D. (2001) "An integrative theory of prefrontal cortex function" *Annu Rev Neurosci.* **24**:167-202.
- Mitirattanakul, S., López-Valdés, H.E., Liang, J., Matsuka, Y., Mackie, K., Faull, K.F. y Spigelman, I. (2007) "Bidirectional alterations of hippocampal cannabinoid 1 receptors and their endogenous ligands in a rat model of alcohol withdrawal and dependence" *Alcohol Clin Exp Res.* **31(5)**:855-67.
- Mogenson, G.J., Jones, D.L. y Yim, C.Y. (1980) "From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system" *Prog Neurobiol.* **14(2-3)**: 69-97.

- Molina-Holgado, F., Lledo, A. y Guaza, C. (1997) "Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes" *Neuroreport* **8**:1929–1933.
- Molina-Holgado, E., Vela, J.M., Arevalo-Martín, A., Almazan, G., Molina-Holgado F., Borrell, J. y Guaza, C. (2002) "Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signalling" *J. Neurosci.* **22**: 9742-53.
- Montgomery, K.C. (1958) "The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour" *Journal of Comparative Physiology* **48**: 254-60.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. y Seeburg, P. H. (1992) "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes" *Science* **256**, 1217–1221.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. y O'Keefe, J. (1982) "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions" *Nature* **297(5868)**:681-3.
- Morrow, A.L., Devaud, L.L., Bucci, D. y Smith, F.D. (1994) "GABAA and NMDA receptor subunit mRNA expression in ethanol dependent rats" *Alcohol Alcohol*; **2**:89–95.
- Muccioli, G.G. y Lambert, D.M. (2005) "Current knowledge on the antagonists and inverse agonists of cannabinoid receptors" *Curr. Med. Chem.* **12**, 1361-1394.
- Munro, S., Thomas, K.L. y Abu-Shaar, M. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids". *Nature* **365**: 61-5.
- Naasila, M., Pierrefiche, O., Ledent, C. y Daoust, M. (2004) "Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice". *Neuropharmacology* **46**: 243-253.
- Nadler, V., Mechoulam, R. y Sokolovsky, M. (1993) "The non-psychotropic cannabinoid (+)-(3S,4S)-7-hydroxy-delta 6- tetrahydrocannabinol 1,1-dimethylheptyl (HU-211) attenuates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in primary cultures of rat forebrain" *Neurosci Lett.* **162(1-2)**: 43-5.
- Nadler, V., Biegon, A., Beit-Yannai, E., Adamchik, J. y Shohami, E. (1995) "45Ca accumulation in rat brain after closed head injury; attenuation by the novel neuroprotective agent HU-211" *Brain Res* **685**: 1–11.

- Nagy, J., Muller, F. y Laszlo, L. (2001) "Cytotoxic effect of alcohol-withdrawal on primary cultures of cortical neurones" *Drug Alcohol Depend.* **61** (2): 155-162.
- Nagy, J. y Laszlo, L. (2002) "Increased sensitivity to NMDA is involved in alcohol-withdrawal induced cytotoxicity observed in primary cultures of cortical neurones chronically pre-treated with ethanol" *Neurochem Int.* **40** (7): 585-591.
- Nagy, J., Kolok, S., Dezso, P., Boros, A. y Szombathelyi, Z. (2003) "Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurones" *Neurochem Int.* **42**: 35-43.
- Navarro, M., Hernández, E., Muñoz, R.M., Del Arco, I., Villanúa, M.A., Carrera, M.R.A. y Rodríguez de Fonseca, F. (1997) "Acute administration of the CB₁ cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat" *Neuroreport* **8**: 491-6.
- Nelson, T.E., Ur, C.L. y Gruol, D.L. (2005) "Chronic intermittent ethanol exposure enhances NMDA-receptor mediated synaptic responses and NMDA receptor expression in hippocampal CA1 region" *Brain Res.* **1048**:69-79.
- Newell, K.A., Deng, C. y Huang, X.F. (2006) "Increased cannabinoid receptor density in the posterior cingulate cortex in schizophrenia" *Exp Brain Res* **172**:556-560.
- Nielsen, M.J., Petersen, G., Astrup, A. y Hansen, H.S. (2004) "Food intake is inhibited by oral oleoylethanolamide" *J Lipid Res.* **45**(6): 1027-9.
- O'Dell, L.E., Roberts, A.J., Smith, R.T. y Koob, G.F. (2004) "Enhanced alcohol self-administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure" *Alcohol Clin Exp Res.* **28**(11):1676-82.
- Obernier, J.A., Boudin, T.W. y Crews, F.T. (2002a) "Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death" *Alcohol Clin Exp Res.* **26**(4):547-57.
- Obernier, J.A., White, A.M., Swartzwelder, H.S. y Crews, F.T. (2002b) "Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats" *Pharmacol Biochem Behav.* **72**(3):521-32.
- Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Moneda, N., Zimmer, A. y Kano, M. (2002) "Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde supresión at hippocampal synapses" *Journal of Neuroscience* **22** (10): 3864-3872.

- Oliva, J.M., Ortiz, S., Palomo, T., y Manzanares, J. (2003) "Behavioral and gene transcription alterations induced by spontaneous cannabinoid withdrawal in mice" *Journal of Neurochemistry* **85**: 94-104.
- Oliva, J.M., Ortiz, S., Pérez-Rial, S. y Manzanares, J. (2008) "Time dependent alterations on tyrosine hydroxylase, opioid and cannabinoid CB(1) receptor gene expressions after acute ethanol administration in the rat brain" *Eur Neuropsychopharmacol.* **18(5)**:373-82.
- Olive, M.F., Koenig, H.N., Nannini, M.A. y Hodge, C.W. (2001) "Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine". *Journal of Neuroscience* **21**: RC184(1-5).
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasentfitz, L. y Uhl, G.R. (2006a) "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain" *Ann. NY Acad. Sci.* **1074**: 514-36.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Sejal, P., Meozzi, P.A., Myers, L., Tagliaferro, P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Sejal, P., Meozzi, P.A., Myers, L., Tagliaferro, P., Hope, B., Leonard, C.M., Uhl, G.R., Brusco, A. y Gardner, E. (2006b) "Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression" *Methods Mol. Med.* **123**: 291-8.
- Ortar, G., Ligresti, A., De Petrocellis, L., Morera, E. y Di Marzo, V. (2003) "Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake". *Biochemical Pharmacology* **65**: 1473-1481.
- Ortiz, S., Oliva, J.M., Pérez-Rial, S., Palomo, T. y Manzanares, J. (2004a) "Differences in basal cannabinoid CB1 receptor function in selective brain areas and vulnerability to voluntary alcohol consumption in Fawn Hooded and Wistar rats". *Alcohol & Alcoholism* **39 (4)**: 297-302.
- Ortiz, S., Oliva, J.M., Pérez-Rial, S., Palomo, T. y Manzanares, J. (2004b) "Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain". *Alcohol & Alcoholism* **39 (4)**: 88-92.
- Pacer, P., Batkai, S. y Kunos, G. (2006) "The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy" *Pharmacol Rev.* **58(3)**: 389-462.

- Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., Lutz, B. y Pasquali, R. (2006) "The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance" *Endocr. Rev.* **27**: 73-100.
- Paladini, C.A., Fiorillo, C.D., Morikawa, H., y Williams, J.T. (2001) "Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons". *Nature Neuroscience* **4**: 275-281.
- Parés, A. y Caballería, J. (2002) "Patología orgánica". En: "Monografía del alcohol" Editor: Antoni Gual. *Adicciones*, Vol. 14, suplemento 1. Pp: 155-173.
- Parolaro, D., Massi, P., Rubino, T. y Monti, E. (2002) "Endocannabinoids and the immune system and cancer" *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* **66 (2-3)**: 319-32.
- Parolaro, D., Viganò, D., Rubino, T. (2005) "Endocannabinoids and drug dependence" *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* **4(6)**:643-55.
- Paxinos G. y Watson C. (1997) "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates" Third Edition. Academic Press. San Diego, California.
- Pazos, M.R, Nuñez, E., Benito, C., Tolon, R.M. y Romero, J. (2005) "Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system" *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* **81(2)**: 239-47.
- Pellow S. y File S. (1986) "Anxiolytic and anxiogenic drug effects in exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat". *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* **24**: 525-9.
- Pellow S., Chopin, P., File, S.E. y Briley M. (1985) "Validation of open: closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat". *Journal of Neuroscience Methods.* **14**: 149-67.
- Pertwee, R. (1997) "Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors". *Pharmacology and Therapeutics* **74**: 129-180.
- Pettit, H.O., Ettenberg, A., Bloom, F.E. y Koob, G.F. (1984) "Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats" *Psychopharmacology (Berl)* **84(2)**:167-73.
- Piazza, P.V., Rouge-Pont, F., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H. y Le Moal, M. (1996) "Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(16)**: 8716-20.

Piazza, P.V. y Le Moal, M. (1997) "Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications" *Brain Res Brain Res Rev.* **25(3)**:359-72.

Piazza, P.V. y Le Moal, M. (1998) "The role of stress in drug self-administration" *Trends Pharmacol Sci.* **19(2)**: 67-74.

Pidoplichko, V.I., Noguchi, J., Areola, O.O., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, T. y Dani, J.A. (2004) "Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction". *Learning & Memory* **11**: 60-69.

Ponce, G., Hoenicka, J., Rubio, G., Ampuero, I., Jiménez-Arriero, M.A., Rodríguez-Jiménez, R., Palomo, T. y Ramos, J.A. (2003) "Association between cannabinoid receptor gene (CNR1) and childhood attention deficit/hyperactivity disorder in Spanish male alcoholic patients" *Molecular Psychiatry* **8**:466.

Porter, A.C., Sauer, J.M., Knierman, M.D., Becker, G.W., Berna, M.J., Bao, J., Nomikos, G.G., Carter, P., Bymaster, F.P., Leese, A.B. y Felder, C.C. (2002) "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the cb1 receptor" *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **301**: 21-24.

Qiang, M., Denny, A.D. y Ticku, M.K. (2007) "Chronic intermittent ethanol treatment selectively alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit surface expression in cultured cortical neurons" *Mol Pharmacol.* **72(1)**:95-102.

Racz, I., Bilkei-Gorzo, A., Toth, Z.E., Michel, K., Palkovits, M. y Zimmer, A. (2003) "A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking". *Journal of Neuroscience* **23**: 2453-2458.

Ramos, J.A. y Fernández-Ruiz, J.J. (2003) "Estado actual de los conocimientos sobre el sistema cannabinoide endógeno" En: *Actualización de los conocimientos acerca del uso terapéutico de los cannabinoides*. Editado por la Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid, pp. 9-28.

Randall, M.D., Kendall, D.A. y O'Sullivan, S. (2004) "The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids" *British journal of pharmacology* **142**: 20-26.

Rasmussen, D.D., Mitton, D.R., Green, J. y Puchalski, S. (2001) "Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 999-1005.

Rassnick, S., Pulvirenti, L. y Koob, G.F. (1993a) "SDZ-205,152, a novel dopamine receptor agonist, reduces oral ethanol self-administration in rats" *Alcohol*. **10(2)**:127-32.

Rassnick, S., Stinus, L. y Koob, G.F. (1993b) "The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in the rat" *Brain Res.* **623(1)**:16-24.

Rassnick, S., Heinrichs, S.C., Britton, K.T. y Koob, G.F. (1993c) "Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal" *Brain Research* **605**, 25–32.

Riegel, A.C. y Lupica, C.R. (2004) "Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signalling at multiple synapses in the ventral tegmental area". *Journal of Neuroscience* **24**: 11070-11078.

Rimondini, R., Sommer, W. y Heilig, M. (2003) "A temporal threshold for induction of persistent alcohol preference: behavioral evidence in a rat model of intermittent intoxication" *J Stud Alcohol*. **64(4)**:445-9.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrié, P., Brelière, J.C. y Le Fur, G. (1994). "SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor". *FEBS Letters* **350**: 240-4.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millán, J., Derocq, J.M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarrau, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Brelière, J.C. y Le Fur, G. (1998) "SR144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **284**: 644-50.

Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Congy, C., Martínez, S., Oustric, D., Péro, A., Poncelet, M., Maruani, J., Arnone, M., Finance, O., Soubrié, P. y Le Fur, G. (2004) "SR147778 [5-(4-Bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-2-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB₁ cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization". *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **310**: 905-14.

Risinger, F.O., Freeman, P.A., Rubinstein, M., Low, M.J. y Grandy, D.K. (2000) "Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D₂ receptor knockout mice" *Psychopharmacology* **152**: 343-350.

- Roberto, M., Schweitzer, P., Madamba, S.G., Stouffer, D.G., Parsons, L.H. y Siggins, G.R. (2004) "Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis" *J Neurosci.* **24(7)**:1594-603.
- Robbins, T.W. y Everitt, B.J. (2002) "Limbic-striatal memory systems and drug addiction" *Neurobiol Learn Mem.* **78(3)**: 625-36.
- Rodgers R.J., Haller J., Halasz J. y Mikics, E. (2003) "'One-trial sensitization' to the anxiolytic-like effects of cannabinoid receptor antagonist SR 141716A in the mouse elevated plus-maze" *The European journal of neuroscience* **17**: 1279-86.
- Rodriguez, J.J., Mackie, K. y Pickel, V.M. (2001) "Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus" *J. Neurosci.* **21**: 823-33.
- Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., Murillo-Rodriguez, E., Giuffrida, A., LoVerme, J., Gaetani, S., Kathuria, S., Gall, C. y Piomelli, D. (2001) "An anorexic lipid mediator regulated by feeding" *Nature* **414** (6860):209-12.
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermúdez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A. y Navarro, M. (2005) "The endocannabinoid system: physiology and pharmacology". *Alcohol & Alcoholism* **40 (1)**: 2-14.
- Romero, J., Lastres-Becker, I., De Miguel, R., Berrendero, F., Ramos, J.A. y Fernández-Ruiz, J.J. (2002) "The endogenous cannabinoid system and the basal ganglia. Biochemical, pharmacological and therapeutic aspects" *Pharmacology & Therapeutics* **95(2)**: 137-52.
- Romero, J., García, L., Fernández-Ruiz, J. J., Cebeira, M. y Ramos, J. A. (1995) "Changes in rat brain cannabinoid binding sites after acute or chronic exposure to their endogenous agonist, anandamide, or to Δ^9 -tetrahydrocannabinol" *Pharmacol. Biochem. Behav.* **51**: 731-737.
- Ron, D. (2004) "Signaling Cascades Regulating NMDA Receptor Sensitivity to Ethanol" *Neuroscientist.* **10(4)**: 325-336.
- Rose, K., Goldberg, M. P. y Choi, D. W. (1993) "Cytotoxicity in murine cortical cell culture" In *In Vitro Biological Methods* (C. A. Tyson and J. M. Frazier, Eds.), pp. 46-60. Academic press, San Diego.

- Rossetti, Z.L. y Carboni, S. (1995) "Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum" *Eur J Pharmacol.* **283(1-3)**:177-83.
- Rossetti, Z.L., Carboni, S. y Fadda, F. (1999) "Glutamate-induced increase of extracellular glutamate through N-methyl-D-aspartate receptors in ethanol withdrawal" *Neuroscience.* **93(3)**:1135-40.
- Rudolph, J.G., Walker, D.W., Iimuro, Y., Thurman, R.G. y Crews, F.T. (1997) "NMDA receptor binding in adult rat brain after several chronic ethanol treatment protocols" *Alcohol Clin Exp Res.* **21(8)**: 1508-19.
- Sah, P. y Lopez De Armentia, M. (2003) "Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala" *Ann N Y Acad Sci* **985**: 67-77.
- Sagredo, O., García-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A. y Fernández-Ruiz, J. (2007) "Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders" *Mol Neurobiol.* **36(1)**: 82-91.
- Sanchís-Segura, C., Cline, B.H., Marsicano, G., Lutz, B. y Spanagel, R. (2004) "Reduced sensitivity to reward in CB1 knockout mice" *Psychopharmacology* **176**: 223-232.
- Sanna, E., Serra, M., Cossu, A., Colombo, G., Follesa, P., Cuccheddu, T., et al. (1993) "Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABAA and NMDA receptor function in the rat brain" *Alcohol Clin Exp Res*; **17**:115-123.
- Santucci, A.C., Cortes, C.C., Bettica, A. y Cortes, F. (2008) "Chronic ethanol consumption in rats produces residual increases in anxiety 4 months after withdrawal" *Behavioural Brain Research* **188(1)**:24-31.
- Schmidt, L.G., Samochowiec, J., Finckh, U., Fiszer-Piosik, E., Horodnicki, J., Wendel, B., Rommelspacher, H. y Hoeche, M.R. (2002) "Association of a CB1 cannabinoid receptor gene (CNR1) polymorphism with severe alcohol dependence" *Drug and alcohol dependence* **65**: 221.
- Schroeder, J.P., Iller, K.A. y Hodge, C.W. (2003) "Neuropeptide-Y Y5 receptors modulate the onset and maintenance of operant ethanol self-administration" *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **27**, 1912-1920.
- Schuckit, M.A. y Smith, T.L. (1996) "An 8-year follow-up of 450 sons of alcoholic and control subjects". *Archives of general psychiatry* **53**: 202-210.

- Serra, S., Carai, M.A.M., Brunetti, G., Gómez, R., Melis, S., Vacca, G., Colombo, G. y Gessa, G.L. (2001) "The cannabinoid receptor antagonist SR 141716 prevents acquisition of drinking behavior in alcohol-preferring rats" *European Journal of Pharmacology* **430**: 369-371.
- Serra, S., Brunetti, G., Pani, M., Vacca, G., Carai, M.A.M., Gessa, G.L. y Colombo, G. (2002) "Blockade by the cannabinoid receptor antagonist, SR 141716, of alcohol deprivation effect in alcohol-preferring rats" *European Journal of Pharmacology* **443**: 95-97.
- Serra, G. y Fratta, W. (2007) "A possible role for the endocannabinoid system in the neurobiology of depression" *Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health*, **3**:25
- Sheela Rani, C.S. y Ticku, M.K. (2006) "Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABAA and NMDA receptor subunits" *Alcohol* **38**:89-97.
- Shen, M., Piser, T.M., Seybold, V.S. y Thayer, S.A. (1996) "Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures" *J Neurosci.* **16(14)**: 4322-34.
- Shi, W.X., Pun, C.L., Zhang, X.X., Jones, M.D. y Bunney, B.S. (2000) "Dual effects of D-amphetamine on dopamine neurons mediated by dopamine and nondopamine receptors". *Journal of Neuroscience* **20**: 3504-3511.
- Sinclair, J.D. y Senter, R.J. (1967) "Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation". *Psychonomic science* **8**: 11-16.
- Sircar, R. y Sircar, D. (2006) "Repeated ethanol treatment in adolescent rats alters cortical NMDA receptor" *Alcohol*. **39 (1)**: 51-58.
- Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L. y Leon, A. (1996) "The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(9)**: 3984-9.
- Smith, B.R., Boyle, A.E.L. y Amit, Z. (1999) "The effects of the GABA_B agonist Baclofen on the temporal and structural characteristics of ethanol intake" *Alcohol* **17 (3)**: 231-240.
- Smith, S. y Sharp, T. (1994) "Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthaldialdehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection" *J. Chromatogr.* **652**, 228-233.

- Solinas, M., Panlilio, L.V., Antoniou, K., Pappas, L.A. y Goldberg, S.R. (2003) "The cannabinoid CB₁ antagonist N-piperidinyl-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed ratio, and progressive ratio schedules of drug self-administration in rats" *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306** (1): 93-102.
- Solinas, M., Panlilio, L.V., Tanda, G., Makriyannis, A., Matthews, S.A., y Goldberg, S.R. (2005) "Cannabinoid agonists but not inhibitors of endogenous cannabinoid transport or metabolism enhance the reinforcing efficacy of heroin in rats" *Neuropsychopharmacology* **30**(11): 2046-57.
- Soria, G., Mendizábal, V., Touriño, C., Robledo, P., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R. y Valverde, O. (2005) "Lack of CB₁ cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration" *Neuropsychopharmacology* **30**(9): 1670-80.
- Spanagel, R. y Zieglgänsberger, W. (1997) "Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes". *Trends in Pharmacological Sciences* **18**: 54-59.
- Sterling, P. y Eyer, J. (1981) "Biological basis of stress-related mortality" *Soc Sci Med* **15**(1):3-42.
- Stella, N., Schweitzer, P. y Piomelli, D. (1997) "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation" *Nature* **388**: 773-8.
- Stella, N. (2004) "Cannabinoid signaling in glial cells" *Glia* **48**:267-277.
- Stromberg, M.F. (2004) "The effect of baclofen alone and in combination with nalrexone on ethanol consumption in the rat". *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **78**: 743-750.
- Su, H.F., Samsamshariat, A., Fu, J., Shan, Y.X., Chen, Y.H., Piomelli, D. y Wang, P.H. (2006) "Oleylethanolamide Activates Ras-Erk Pathway and Improves Myocardial Function in Doxorubicin-Induced Heart Failure" *Endocrinology* **147**(2): 827-834.
- Suardíaz, M., Estivill-Torrús, G., Goicoechea, C., Bilbao, A. y Rodríguez de Fonseca, F. (2007) "Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain" *Pain*. **133**(1-3): 99-110.

- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A. y Waku, K. (1995) "2-Arachidonylglycerol: a possible endogenous CB receptor ligand in brain". *Biochemical and Biophysical Research Communications* **215** (1): 89-87.
- Sugiura, T., Kobayashi, Y., Oka, S. y Waku, K. (2002) "Biosynthesis and degradation of anandamida and 2-arachidonoyl-glycerol and their possible physiological significance". *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acid* **66**: 173-192.
- Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. y Gokoh, M. (2006) "Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand" *Prog. Lipid Res.* **45**: 405-446.
- Suzuki, R., Lumeng, L., McBride, W.J., Li, T.K. y Hwang, B.H. (2004) "Reduced neuropeptide Y mRNA expression in the central nucleus of amygdala of alcohol preferring (P) rats: its potential involvement in alcohol preference and anxiety" *Brain Res.* **1014**, 251-254.
- Szabo, B., Muller, T. y Koch, H. (1999) "Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro". *Journal of Neurochemistry* **73**: 1084-1089.
- Szabo, B., Siemes, S. y Wallmichrath, I. (2002) "Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids". *European Journal of Neuroscience* **15**: 2057-2061.
- Tanaka, F.Y., Shiratori, Y., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tsukada, Y. y Omata, M. (1997) "Polymorphism of alcohol-metabolizing genes affects drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese men" *Alcohol Clin Exp Res* **21**: 596-601.
- Tanda, G., Munzar, P. y Goldberg, S.R. (2000) "Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys" *Nature Neuroscience* **3**: 1073-1074.
- Tang, A., George, M.A., Randall, J.A. y Gonzales, R.A. (2003) "Ethanol increases extracellular dopamine concentrations in the ventral striatum in C57BL/6 mice" *Alcoholism, clinical and experimental research* **27**: 1083-1089.
- Terrazzino, S.; Berto, F.; Dalle Carbonare, M.; Fabris, M.; Guiotto, A.; Bernardini, D. y Leon, A. (2004) "Stearoylethanolamide exerts anorexic effects in mice via downregulation of liver stearoyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression" *The FASEB Journal* **18**(13): 1580-1582
- Thielen, R.J., Morzorati, S.L. y McBride, W.J. (2001) "Effects of ethanol on the dorsal raphe nucleus and its projections to the caudate putamen". *Alcohol* **23** (3): 131-9.

- Thirunavukkarasu, V., Anuradha, C.V. y Viswanathan, P. (2003) "Protective effect of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds in experimental ethanol toxicity" *Phytother Res.* **17**(7): 737-43.
- Thomas, M.P. y Morrisett, R.A. (2000) "Dynamics of NMDAR-mediated neurotoxicity during chronic ethanol exposure and withdrawal" *Neuropharmacology* **39**(2): 218-226.
- Thomas, J.D., Fleming, S.L. y Riley, E.P. (2002) "Administration of low doses of MK-801 during ethanol withdrawal in the developing rat pup attenuates alcohol's teratogenic effects" *Alcohol Clin Exp Res.* **26**(8):1307-13.
- Thomasson, H.R., Crabb, D.W., Edenberg, H.J., Li, T.K., Hwu, H.G., Chen, C.C., Yeh, E.K., et al. (1994) "Low frequency of the *ADH2*2* allele among Atayal natives of Taiwan with alcohol use disorders" *Alcohol Clin Exp Res* **18**: 640–643.
- Tomida, I., Pertwee, R.G. y Azuara-Blanco, A. (2004) "Cannabinoids and glaucoma" *The British journal of ophthalmology* **88**(5): 708-13.
- Tomkins, D.M. y Sellers, E.M. "Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence" *CMAJ* 2001; **164**: 817-21.
- Trevisan, L., Fitzgerald, L.W., Brose, N., Gasic, G.P., Heinemann, S.F., Duman, R.S., et al. (1994) "Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus" *J Neurochem*, **62**:1635–8.
- Tsai, G. y Coyle, J.T. (1998) "The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism" *Annu Rev Med*, **49**:173–184.
- Tsai, G., Gastfriend, D.R. y Coyle, J.T. (1995) "The glutamatergic basis of human alcoholism" *Am J Psychiatry*; **152**:332–340.
- Valdez, G.R. y Koob, G.F. (2004) "Allostasis and dysregulation of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y systems: implications for the development of alcoholism" *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **79**: 671-689.
- Valdez, G.R., Sabino, V. y Koob, G.F. (2004) "Increased anxiety-like behavior and ethanol self-administration in dependent rats: reversal via corticotropin-releasing factor-2 receptor activation" *Alcohol Clinical and Experimental Research* **28**: 865–872.

- Valenti, M., Cottone, E., Martinez, R., De Pedro, N., Viveros, M.P., Franzoni, M.F., Rubio, M., Delgado, M.J. y Di Marzo, V. (2005) "The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake" *Journal of Neurochemistry* (*in press*).
- Van der Stelt, M. y Di Marzo, V. (2005) "Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection" *Neuromolecular Med.* **7**(1-2):37-50.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D. y Sharkey, K.A. (2005) "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors" *Science* **310**: 329-32.
- Veatch, L.M. y Gonzalez, L.P. (1996) "Repeated ethanol withdrawal produces site-dependent increases in EEG spiking" *Alcohol Clin Exp Res.* **20**(2):262-7.
- Venance, L., Piomelli, D., Glowinski, J. y Giaume, C. (1995) "Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes" *Nature* **376**:590-594.
- Vetulani, J. (2001) "Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction". *Polish journal of pharmacology* **53**: 303-317.
- Vinod, K.Y. y Hungund, B.L. (2005) "Endocannabinoid lipids and mediated system: Implications for alcoholism and neuropsychiatric disorders". *Life Sciences* **77**: 1569-1583.
- Vinod, K.Y., Arango, V., Xie, S., Kassir, S.A., Mann, J.J., Cooper, T.B. y Hungund, B. (2005) "Elevated levels of endocannabinoids and CB1 receptor-mediated G-protein signalling in the prefrontal cortex of alcoholic suicide victims". *Biological Psychiatry* **57**: 480-486.
- Vinod, K.Y., Yalamanchili, R., Xie, S., Cooper, T.B., Hungund, B.L. (2006) "Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system" *Neurochem. Intern.* **49**, 619-625.
- Vinod, K.Y., Sanguino, E., Yalamanchili, R., Manzanares, J., Hungund, B.L. (2008) "Manipulation of fatty acid amide hydrolase functional activity alters sensitivity and dependence to ethanol" *J Neurochem.* **104**(1): 233-43.
- Viveros, M.P., Marco, E.M. y File, S.E. (2005) "Endocannabinoid system and stress and anxiety responses" *Pharmacol. Biochem. Behav.* **81**: 331-42.

- Wallner, M., Hancher, H.J. y Olsen, R.W. (2006) "Low dose acute alcohol effects on GABAA receptor subtypes" *Pharmacology & Therapeutics* **112**: 513–528.
- Wang, G., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A. y Kunos, G. (2003) "Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age dependent decline in mice" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1393-1398.
- Weiss, F. y Porrino, L.J. (2002) "Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges". *The Journal of Neuroscience* **22** (9): 3332-3337.
- Wenger, T., Moldrich, G. y Furst, S. (2003) "Neuromorphological background of cannabis addiction". *Brain Research Bulletin* **61**: 125-128.
- Wiley, J.L., Burston, J.J., Leggett, D.C., Alekseeva, O.O., Razdan, R.K., Mahadevan, A. y Martin, B.R. (2005) "CB₁ cannabinoid receptor-mediated modulation of food intake in mice" *British Journal of Pharmacology* **145** (3): 293-300.
- Wilson, C.A., González, I. y Farabollini, F. (1991) "Behavioral effects in adulthood of neonatal manipulation of brain serotonin levels in normal and androgenized females" *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* **41**: 91-8.
- Wilson, R.I. y Nicoll, R.A. (2001) "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses" *Nature* **410**:588–592.
- Wilson, R.I. y Nicoll, R.A. (2002) "Endocannabinoid signaling in the brain" *Science* **296**: 678-682.
- Wurst, F.M., Rasmussen, D.D., Hillemecher, T., Kraus, T., Ramskogler, K., Lesch, O., Bayerlein, K., Schanze, A., Wilhelm, J., Junghanns, K., Schulte, T., Dammann, G., Pridzun, L., Wiesbeck, G., Kornhuber, J., Bleich, S. (2007) "Alcoholism, craving, and hormones: the role of leptin, ghrelin, prolactin, and the pro-opiomelanocortin system in modulating ethanol intake" *Alcohol Clinical and Experimental Research* **31**(12):1963-7.
- Yamamoto, T. y Takada, K. (2000) "Role of cannabinoid receptor in the brain as it relates to drug reward". *Japanese journal of pharmacology* **84**: 229-36.

Zhang, M., Martin, B.R., Adler, M.W., Razdan, R.K., Jallo, J.I. y Tuma, R.F. (2007) "Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model." *J Cereb Blood Flow Metab.* **27(7)**:1387-96.

Zhang, Z., Morse, A.C., Koob, G.F., Schulteis, G. (2007) "Dose- and time-dependent expression of anxiety-like behavior in the elevated plus-maze during withdrawal from acute and repeated intermittent ethanol intoxication in rats" *Alcohol Clinical and Experimental Research* **31(11)**:1811-9.

Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Moreira, F.A. y Guimarães, F.S. (2006) "Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug" *Braz J Med Biol Res.* **39(4)**:421-9.

